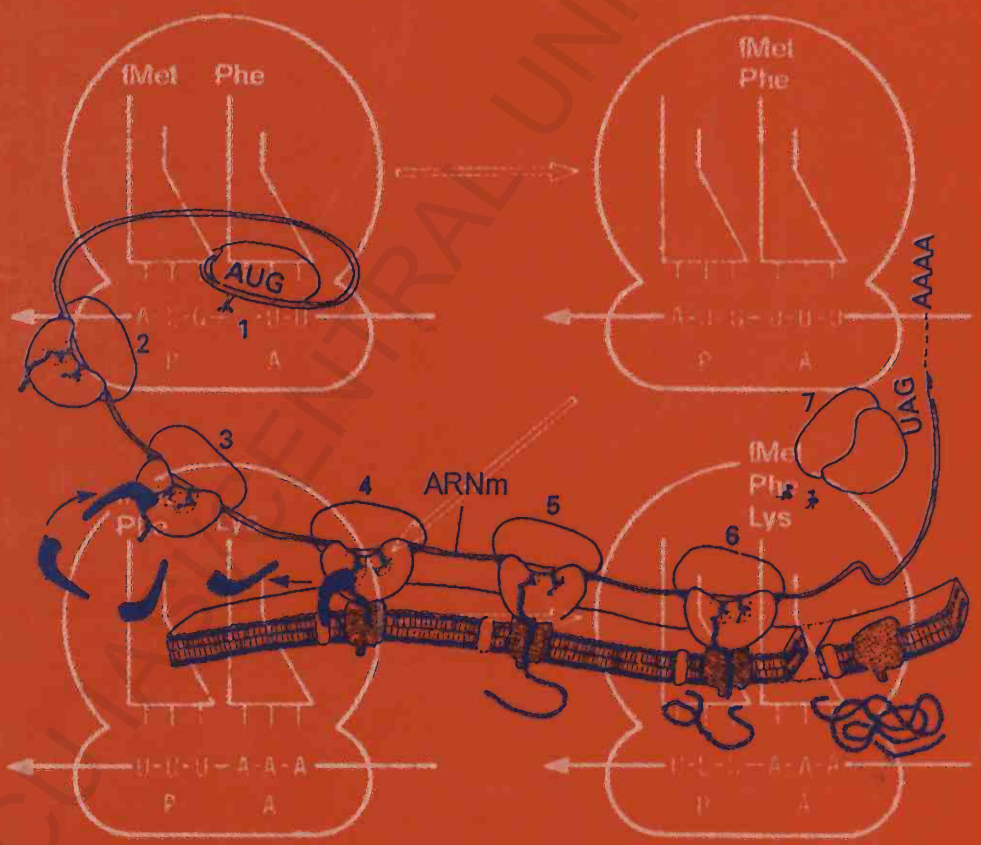
PETER N. CAMPBELL
ANTHONY D. SMITH

Biochimie ilustrată



IV 74.607

Editura Academiei Române

BIBL. CENTR. UNIV.
„M. EMINESCU" IAŞI
IV 74.607

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Biochimie ilustrată

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

FOURTH EDITION

Biochemistry Illustrated

Peter N. Campbell
Anthony D. Smith

CHURCHILL LIVINGSTONE

UNIVERSITY LIBRARY

Peter N.Campbell
Profesor Emerit de Biochimie
University College Londra

Anthony D. Smith
Cercetător Emerit în Biochimie
University College Londra

383.263

Biochimie ilustrată

Traducere în limba română
Prof. dr. Carmen Socaciu (coordonator)

ALE

376160
B.C.U. IASI

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Editura Academiei Române
București, 2004

CHURCHILL LIVINGSTONE
A Division of Elsevier Science

Churchill Livingstone, P.O.Box 878, Kimberton, PA 19442, USA

© Elsevier Science 2000

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without either the prior permission of the publishers (The Romanian Society for Biochemistry and Molecular Biology, branch Cluj-Napoca)

Copyright © 2004. Toate drepturile pentru ediția în limba română sunt rezervate Societății Române de Biochimie și Biologie Moleculară, filiala Cluj-Napoca.
Publicarea ediției a fost realizată sub îngrijirea Editurii Academiei Române.

EDITURA ACADEMIEI ROMÂNE
Calea 13 Septembrie nr. 13, sector 5
050711, București, România, P.O. Box 5–42
Tel.: 4021-411 90 08; 4021-410 32 00,
E-mail: edacad@ear.ro
Internet: http://www.ear.ro

Traducerea:
Prof. dr. Carmen Socaciu – coordonare + cap. 1,3, 5, 13, 15,16
Șef lucr. dr. Adela Pintea – cap. 7, 9, 10, 11, 12, 14
Șef lucr. dr. Sanda Andrei – cap. 6,8
Șef lucr. drd. Gino Roșca – cap. 2,4
Departamentul de Biochimie
Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară
Cluj-Napoca

Referenți științifici:
Prof. dr. Octavian Popescu
Membru corespondent al Academiei Române
(referent cap. 1–3)

Cercetător științific principal I, dr. Ștefana Petrescu
Director, Institutul Național de Biochimie

Procesare imagini, tehnoredactare, coperta: Lucian Andrei

Coperta
Coperta include procesele de traducere la nivel ribozomal (Fig. 3.51) și semnalul pentru biosinteza proteinelor (Fig. 3.75)

Redactori: Adina Oana, Doina Argeșanu
Tehnoredactor: Luiza Stan

Bun de tipar: 19.04.2004 Coli de tipar: 30
C.Z. pentru biblioteci mari: 577.1(084)
C.Z. pentru biblioteci mici: 57

ISBN: 973-27-1044-6

Imprimat în România

23. FEB. 2005

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Prefață la ediția în limba română

Este o plăcere pentru noi, ca autori ai ediției originale în limba engleză a „Biochimiei ilustrate" de a saluta traducerea și publicarea ei în limba română. Ideea care ne-a condus în edițiile anterioare a fost aceea de a oferi studenților imagini și figuri ușor de înțeles, cu text redus, dar relevant, ca rezumat al ilustrațiilor.

Acum, prin ediția a 4-a, menită să prezinte o imagine succintă a noțiunilor actuale din biochimie, oferim o carte de dimensiuni reduse, dar care sperăm că va încuraja studenții pentru a progresa în cunoașterea și înțelegerea unor texte de specialitate.

În pregătirea acestei ediții, scopul nostru a fost de a introduce și aspectele genetice ale biochimiei, care interferă firesc cu subiectele integrate din ultimele capitole. Intermediar, oferim noțiuni esențiale privind structura celulară, structura aminoacizilor, a proteinelor, metabolismul glucidic, lipidic sau proteic. Forma textului este neuzuală, dar urmărește îndeaproape ilustrațiile și deci se adaptează la imagine.

Se discută mult despre valoarea tratatelor traduse în limba maternă a studenților. Nu noi, vorbitorii de limbă engleză, suntem aceia care putem avea o opinie dogmatică în această problemă. Considerăm ca fiind esențială pentru studenți, existența în limba națională a unor cărți comprehensive, concentrate în informație și cu noțiuni nou apărute în specialitate. Este o variantă preferabilă și mai binevenită, decât traducerea unor tratate voluminoase, care pot fi consultate în limba engleză de către doctoranzi sau cercetători avansați.

Se pare că, în general, nevoia de a traduce această carte a fost mare, întrucât toate edițiile anterioare au fost traduse în mai multe limbi – fapt care evident i-a încurajat și pe traducătorii entuziaști ai acestei noi ediții în limba română.

Sperăm foarte mult ca efortul și competența lor să fie încununate de succes.

P.N. Campbell și A.D. Smith

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Prefață la ediția în limba engleză

Cartea cu acest titlu a fost inițial publicată în 1982. Obiectivul la acea dată a fost realizarea unui compendium al biochimiei cu numeroase ilustrații, cu dorința de a oferi o introducere în subiect într-o formă ușor asimilabilă.
Am sperat ca figurile clar prezentate să fie utile pentru cadre didactice și să poată ajuta pe cei din alte discipline, care să fie la zi cu noutățile majore din domeniu. În consecință, în edițiile ulterioare am adăugat texte noi, cu toate că nu s-au făcut schimbări substanțiale în organizarea materialelor.

Această ediție aduce o schimbare majoră în prezentare și organizare, oferind un text ce însoțește proporția mare a ilustrațiilor.
Cea mai importantă schimbare, în organizare este introducerea elementelor de structură și funcții ale genelor, imediat după capitolul de aminoacizi și proteine, întrucât aceste concepte ating toate aspectele genetice ale biochimiei. Această introducere în aspectele genetice ale biochimiei ne-a permis ca în capitolele următoare să prezentăm influența genomului, în special în capitolele asupra structurii proteice și a metabolismului intermediar. În capitolul final s-au prezentat succint anumite subiecte de o semnificație aparte în viitorul apropiat. Scopul nostru rămâne de a oferi o percepție corectă a biochimiei și biologiei moleculare pentru studenții la medicină și științe, care au nevoie de cunoștințe de bază, un efect introductiv.

Formatul mai mare al acestei ediții a permis introducerea unor ilustrații adiționale. Suntem foarte recunoscători multor colegi ai noștri de pretutindeni care ne-au trimis corecții și sugestii pentru îmbunătățirea ediției a 3-a. În plus, diferitele ediții au fost traduse în 8 limbi; în multe cazuri traducătorii au constatat erori și ne-au informat. A fost cazul prof. Todosi Nikolov de la Universitatea din Sofia, care a făcut anumite sugestii în timpul traducerii textului în limba bulgară. Suntem foarte recunoscători tuturor prietenilor și îi asigurăm că am încercat să beneficiem de ajutorul lor.

Suntem recunoscători editorilor și în special lui Timothy Horne și Barbara Simmons, care au asigurat cu grijă designul fiecărei pagini pentru a corespunde dorințelor noastre. Fără îndoială, am fi bucuroși să primim de la cititori sugestii pentru eforturile noastre viitoare.

2000

PNC
ADS

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cuvântul traducătorilor

Biochimia ilustrată, acum în Limba Română !

„Biochimie ilustrată" este o carte remarcabilă din cel puțin 3 puncte de vedere:

- concentrează într-o formă integrată, extrem de sistematică și sugestivă, cele mai importante structuri, mecanisme și procese biochimice care au loc la nivel celular, tisular sau sistemic.
- introduce și exemplifică noțiuni actuale și fenomene complicate prin figuri și imagini însoțite de text minim dar esențial, simplu de înțeles urmărit
- este accesibilă întelegerii cititorului, devenind manual universitar „universal" pentru studenții care învață biochimia la cele mai diverse specializări: biologie, medicină și farmacie, biofizică sau chimie, biotehnologii vegetale sau animale, știința și tehnologia alimentelor, științe agricole etc.

Această carte, care a ajuns la ediția a 4-a în interval de numai 17 ani, a fost inițial concepută ca manual-curs de referință pentru studenții Universității din Londra, dar a fost apoi tradusă în mai mult de 10 limbi, fiind extrem de apreciată de profesori și studenți din universități europene sau americane.

Autorii cărții sunt personalități recunoscute la nivel internațional în domeniul Biochimiei, fiind implicați în conducerea Federației Europene a Societăților de Biochimie (FEBS). Prin această carte, ei demonstrează calități didactice deosebite, oferind, așa cum am menționat mai sus multe facilități de înțelegere a unor fenomene complicate printr-un limbaj simplu dar elocvent, ce poate fi dedicat nu numai studenților sau doctoranzilor, dar și unor cercetători avizați .

Mulțumim pe această cale îndeosebi profesorului Peter Campbell, unul din entuziaștii promotori și susținători ai biochimiei din România, cel care ne-a stimulat, încurajat și suținut pentru a realiza progrese în acest domeniu în universitățile și institutele de cercetare din România, inclusiv prin traducerea acestei cărți. Mulțumim dlui John Scott, reprezentantul editurii Churchill Livingstone-Elsevier, UK care ne-a oferit facilități pentru licența drepturilor de publicare a acestei ediții.

Mulțumim referenților cerc. pr. I, dr. Ștefana Petrescu, director al Insitutului Național de Biochimie București și prof. dr. Octavian Popescu, catedra de Genetică, Universitatea „Babeș-Bolyai" Cluj-Napoca, membru corespondent al Academiei Române pentru competenta revizie a materialului tradus. Mulțumim, de asemenea, d-lui Lucian Andrei pentru realizarea tehnică a imaginilor și textului, precum și pentru concepția copertei.

Prof. dr. Carmen Socaciu

Aprilie 2004

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Sursele de informații bibliografice

În versiunea în limba română au fost utilizate aceleași ilustrații ca și în ediția originală. Reproducem în continuare sursele folosite și mulțumirile autorilor adresate celor care au oferit sursele de ilustrație ale cărții, din publicațiile lor anterioare, precum și celor care au pregătit reproducerea acestor ilustrații. Mulțumirile se referă pe rând la:

a. Autorii și editorii cărților și a articolelor originale de sinteză din reviste. Utilizarea acestor materiale a fost gândită și permisă de către autorii copyright-ului. Lista poate fi de folos pentru cei care doresc să se documenteze suplimentar.

b. Acele persoane care au oferit materiale din surse proprii sau care ne-au ajutat în alte feluri.

În toate cazurile, numerele din paranteze [ ] se referă la numărul ilustrației din această carte. Celelalte numere se referă la sursa bibliografică originală.

SURSE BIBLIOGRAFICE (CĂRȚI ȘI REVISTE)

1. Tratate și manuale generale

1.1 *Basic Biochemistry for Medical Students*
(Campbell, P.N. & Kilby, B.A., eds), Academic Press, London.
Pe lângă editori, autorii cărții au fost: J.B.C. Findlay, H. Hassall, R.P. Hullin, A.J., Kenny și J.H. Parish.
Figurile 2.8 [2.6], 2.10 [2.7], 2.15 [2.5], 4.10 [4.2], 4.16 [2.15], 4.18 [2.12], 5.24 [6.41], 12.3 [3.19], 12.12 [3.43], 12.16 [3.48], 12.23 [3.51], 12.27 [3.54], Tabel 2.8 [Tabel 2.1]

1.2 *Biochemistry with Clinical Correlations,* ed.II, (Devlin, T.M., ed.)
J.Wiley, New York.
Fig. 3.6 [6.32], 6.39 [6.48], 6.50 [9.33], 6.51 [9.34]

1.3 *Biochemistry* (Stryer, L.)
W.H. Freeman, Oxford. Ed. II
Fig. 4.2 [4.16], 4.3 [4.17], 4.6 [4.18], 4.20 [4.15], 30.21 [3.31] ed. III,
Fig. 2.45 [2.24], Fig 3.16 [2.8], 29.24 [3.65], 29.29 [3.59]

1.4 *Principles of Biochemistry,* ed.VI, (White, A., Handler, P., Smith, B.L., Hill, R.L. Lehman, I.R.)
McGraw-Hill, New York.
Fig. 36.1 [5.27], 36.2 [5.28], 36.4 [5.31], 36.5 [5.33], 36.9 [5.32]

1.5 *Molecullar Biology* (Freifelder, D.)
Jones and Bartlett, Boston
Fig. 4.32 [3.5], 21.27 [3.32]

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1.6 *Biochemistry for the Medical Sciences* (Newsholme, E.A. & Leech, A.R.)
Wiley, Chichester
Fig. 7.9 [13.16], 11.5 [13.10]

1.7 *Biochemistry* (Mathews C.K. & van Holde K.B.)
Benjamin Cummings, Redwood City, CA..
Fig. 11.1 [6.16], 28.35 [3.82], 28.36 [3.83]

1.8 *Essential Immunology*, ed. 6a (Roitt, I.M.)
Blackwell Scientific, London.
Fig. 7.10 [5.20]

1.9 *Gray's Anatomy,* ed. 37 (Williams, P.L., Warwick, R., Dyson, M. & Bannister, L.H., eds)
Churchill Livingstone, Edinburgh.
Fig. 1.75B [15.52]

1.10 *Harper's Biochemistry*, ed.XXI, (Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes P.A. & Rodwell V.W.)
Prentice-Hall, New York
Fig. 55.2 [2.13]

1.11 *Principles of Biochemistry* (Lehninger, A.L., Nelson, D.L. & Cox, M.M.)
Worth Publishers, New York
Fig. 2-24 [1.8]. This figure was adapted from *Molecular Biology of Cells,* ed. II, pp.165-166,
Garland Publishing Inc., New York.

1.12 *Biochemistry,* ed. II (Voet, D. & Voet, J.G.)
John Wiley & Sons, Inc., New Jersey
Fig.29-37 [3.60]

1.13 *Biochemistry,* ed. IV (Stryer, L.),
W:H.Freeman and Company, Oxford. Used with permission.
Fig.15.4 [5.29], 15.9 [5.30], 15.33 [5.34], 15.42 [5.35], 37.35 [3.70]

1.14 *Biochemistry and Molecular Biology* (Elliott, W:H. & Elliott, D. C.)
Oxford University Press, Oxford, with permission.
Fig. 25.5 [5.11], 25.7 [5.12], 25.8 [5.13]

1.15 *Biochemistry, Molecules, Cells and the Body* (Dow.J, Lindsay, G. & Morrison)
Addison- Wesley Longman Ltd., Harlow. Reprinted with permission
Fig. 16.17 [5.18], 16.19 [5.19]

1.16 *Biochemistry* (Mathews, C.K. & van Holde, K.E.)
Benjamin/Cummings, Redwood City, CA.
Fig. 25E.1, p. 955 [3.27]

2. Cărți cu subiecte specifice

2.1 *Open University Course Book* S322 Units 1-2 (1977)
Open University Press, Milton Keynes
Fig. 3, p. 14 [2.23]

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2.2 *Cells and Organelles,* 2nd edn (Novikoff,A.B. & Holtzmann, E.)
Holt, Rinehart &Winston, New York
Fig. 1.25 [1.10]

2.3 *Enzyme Structure and Mechanism,* ed.II, (Fersht,A.)
W.H. Freeman, Oxford.
Fig. 1.12 [6.8,6.9], 1.13 [6.46], 10.3 [6.31], 12.13 [6.10]

2.4 *Chance and Necessity* (Monod J., Trans by Wainhouse, A.)
A.A. Knopf, New York, and William Collins, London
p.47, Fig.4 [3.64]

2.5 *The Structure and Function of Animal Cell Components* (Campbell, P.N.)
Pergamon Press, Oxford
Fig. 5.2 [8.22]

2.6 *Advancing Chemistry* (Lewis, M. & Waller, G.)
Oxford University Press, Oxford.
p.311 [9.22]

2.7 *Supplement to DNA Replication* (Kornberg,A.)
W:H. Freeman, San Francisco
Frontispiece [3.22]

2.8 *Molecular Basis of Antibiotic Action,* ed.I, (Gale, E.G., Cundliffe, B., Reynolds, P.E., Richmond, M.E. & Waring, M.J., ed.)
Wiley Interscience, New York.
Cundliffe, E., p. 278 [3.34]
Waring, M.J., p.173 [3.55]

2.9 *Structure of Mitochondria* (Munn, E.A. ed.)
Academic Press, London. Kroger, A. & Klingenberg, M.
p. 282 [9.18]

2.10 *A Guided Tour of the Living Cell* (Christian de Duve)
Scientific American Library-Illustration © 1982 Neil Hardy
p. 272 [3.75], p. 344 [3.63]

2.11 *Molecular Biology of the Cell* (Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J.D., eds),
Garland, New York..
ed. I, Fig. 8.24 [3.12],
ed. II Fig. 11.35 [15.41], 11.47 [15.42]

2.12 *Immunology* (Eisen, H.N.)
Harper & Row, New York.
p.132 [5.17]

2.13 *Principles of Gene Manipulation,* 3rd edn (Old, R. W & Primrose, S.B.)
Blackwell Scientific, Oxford
Fig. 1.3 [3.87], 1.4 [3.88]

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2.14 *From Cells to Atoms* (Rees, A.R. & Steinberg, M.J..E.)
Blackwell Scientific, Oxford.
Fig. 10.1 [4.22], 11.2 [5.9], 26.1 [3.11], 40.2 [5.21] 41

2.15 *Recombinant DNA.A Short Course* (Watson, J.D., Tooze J. & Kurtz, D.T.)
Scientific American Books.
Fig. 5-4 [3.26]

2.16 *Immunology,* ed.I, (Roitt, I.M., Brostoff, J. & Male, D.K.)
Churchill Livingstone, Edinburgh, and Gower, London.
Fig. 7.8 [5.22]

2.17 *Separation of Plasma Proteins* (Curling,J.M., ed.)
Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala.
Fig. 39 [2.18]

2.18 *Albumin, An Overview and Bibliography*
Miles Laboratories, TN.
Physiological transport functions of albumin [5.2]

2.19 *The Ultrastructural Anatomy of the Cell* (Allen, T.D.)
Cancer Research Campaign, London.
[1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7]

2.20 *Biochemical Messengers* (Hardie, D.G.)
Chapman and Hall, London.
Fig. 6.6 [15.18], 8.43 [6.35]

2.21 *Molecular Biology and Biotechnology* (Smith, C.A. &Wood, E.J., eds)
Chapman and Hall, London.
Fig. 4.4 [3.53], 4.12 [3.52], 7.8 & 7.19 [3.67]

2.22 *Gene Regulation* (Latchman, D.)
Unwin Hyman, London.
Fig. 7.9, 7.10 [3.66, 3.68]

2.23 *The New Genetics and Clinical Practice* 3rd edn (Weatherall, D.J.)
Oxford University Press, Oxford.
Fig. 79 [3.89]

2.24 *Introduction to Protein Structure* (Branden C. & Tooze J.)
Garland Publishing, NewYork & London.
Fig. 2.6 & 2.7 [4.4]

2.25 *Molecular Biology of Oncogenes and Cell Control Mechanisms,*
(Parker, *P.J.* & Katan, M., eds)
Ellis Horwood, Chichester.
p. 85, Fig. 5 [6.22], p. 89, Fig. 7 [6.23], p. 90, Fig. 8 [6.24]

2.26 *Gene Structure and Transcription*, ed. II, (Beebee, T. & Burke, J.)
IRL Press, Oxford. With permission of Oxford University Press.
Fig. 4.9 [3.69]

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

3. Articole de sinteză

3.1 *Companion to Biochemistry* (Bull, A. T., Lagnado, J.R., Thomas, J.O. & Tipton, K.E, eds)
Longman, London, Campbell, P.N. (1979) 2, Fig. 8.1 [3.73]

3.2 *FEBS Symposium Vol.* 53 (Rapoport, S. & Scherve, T., eds)
Pergamon Press, Oxford.
Grant, M.E., pp. 29-41 [3.76]

3.3 *The Plasma Proteins* (Putnam, F.W, ed.)
Academic Press, London.
Putnam, F.W, vol. III, p.14 [5.1.4]

3.4 *The Enzymes,* 3rd edn (Boyer, P.D., ed.)
Academic Press, London.
Dickerson, R.E. &Timkovich, R., vol. XI, p. 441, Fig. 8 [6.45]

3.5 *Essays in Biochemistry* (Campbell, P.N., Grevil1e, G.D., Dickens.E, Marshall, R.D. & Tipton, K.E, eds)
Academic Press, London.
Williamson, A.R. (1982) 18, p. 24, Fig. 13 [3.62]
Sekiguchi, K., Maeda, T. &Titani, K. (1991) 26, p. 41, Fig. 2 [15.55], p. 40. Fig.1 [15.56]
Hall, L. & Campbell, P.N. (1986) 22, p. 3, Fig. 1 [4.25], Tabel 1 [4.26]
Grant, P.T. & Coombs, T.L. (1970) 6, p. 76; Fig. 3 [3.40]

3.6 *Current Topics in Cell Regulation* (Horecker, B.L. & Stadtman, E.R., eds)
Academic Press, London.
Masters, CJ. (1977) 12, p. 77, Fig. 2 [6.30]

3.7 *Trends in Biochemical Sciences*
Elsevier/North Holland, Amsterdam.
Huber, M. (1979) 4, p. 271, Fig. 7 [5.16]
Spiegel, A.M., Backlund, P.S.jr, Butrynski, J.E., Jones, T.L.Z. & Simonds, WF (1991) 16, p. 339, Fig. 1 [15.6]

3.8 *Seminars in Hematology*
Grune and Stratton, NewYork.
Rachmilewitz, E.A. (1974) 11, p. 453, Fig. 5 [4.11]

3.9 *Annual Reviews of Medicine*
Annual Reviews, CA.
Stamatoyannopoulos, G., Belingham,AJ., Lenfant, C. & Finch, C.A. (1971) 22, p. 224, Fig.1 [4.21]

3.10 *Annual Reviews of Biochemistry*
Annual Reviews, CA.
(McIntosh, J.R. & Snyder, J.A. (1976) 45, p. 706, Fig. 1 [15.44]
Klee, C.B., Crouch, T.H. & Richman, P.G. (1980) 49, p. 496, Fig. 1 [6.25]
Ferguson, M.A.J. &Williams, A.F. (1988) 57, p. 292, Fig. 1 [15.7] modificată Strynadka, N.CJ. & James, M.N.G. (1989) 58, p. 962, Fig. 1 [6.26]

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Edelman, G.M. & Crossin, K.L. (1991) 60, pp. 158,159, Fig. 1 [15.53]

Kaziro, Y., Itoh, H., Kozasa, T., Nakafuku, M. & Satoh, T. (1991) 60, p. 361, Fig. 5 [15.24]

Dohlman, H.K., Thorner,J., Caron, M.G. & Lefkowitz, RJ. (1991) 60, p. 662, Fig. 1a [15.11]

3.11 *Scientific American*

Grobstein, C. (1977) July, p. 30 [3.85]

Brown, M.S. & Goldstein, J.L. (1984) Nov., p.55 [230], p. 56 [15.10]

Rothman, J.E. (1985) Sept., p. 86 [3.77]

Lodish, H.F. & Dautry-Varsat, A. (1984) May, p.51 [15.10]

Gallo, R.C. (1987) Jan., p. 46 [3.33]

3.12 *Biochimica et Biophysica Acta*

Elsevier/North Holland, Amsterdam.

Lotan, R. & Nicolson, G.L. (1979) 559, p. 239 [15.5]

Kagawa, Y. (1978) 505, p. 47 [15.48, 15.49]

Small, D.M., Penkett, S.A. & Chapman, D. (1969) 176, p. 178, Fig. 7 [12.13] 3.13

3.13 *Biomedicine*

Springer International, Berlin.

Maclouf, J., Sors, H. & Rigaud, M. (1977) 26, p. 362 [14.19]

3.14 *Haemoglobin and Red Cell Structure and Function* (Brewer, GJ., ed.)

Plenum Press, London (1972).

Brenna, O., Luzzana, M., Pace, M., Perrella, M., Rossi, F, Rossi, F, RossiBernardi,

L. & Roughton, FJ. W, p. 20, Fig. 1 [4.20]

3.15 *Advances in Protein Chemistry*

Academic Press, NewYork (1981).

Richardson, J.S. 34, p. 262, Fig. 73, p. 263, Fig. 74, p. 266, Fig. 77 [4.22]

3.16 *Advances in Enzyme*

Regulation Pergamon Press, Oxford.

Saggerson, D., Ghadiminejad, I. & Awan, M. (1992) 32, p. 286, Fig. 1 [13.19]

3.17 *Biochemistry*

American Chemical Society, Washington, DC.

Stroud, R.M., McCarthy, M.P. & Shuster, M. (1990) 29, p. 11013, Fig. 3 [15.15] Huber, R. &

Carrell, R.W (1989) 28, modified from p. 8960, Fig. 2 [4.24]

3.18 *Cell*

MIT Press, Cambridge, MA.

Cantley, L.C., Auger, K.R., Carpenter, C., Duckworth, B., Graziano, A., Kapeller, R. & Soltoff, S.

(1991) 64, p. 282, Fig. 1 [15.34], p. 285, Fig. 4 [15.35]

2.19 *Bioessays*

The Company of Biologists Limited, Cambridge.

Dustin M.L (1990) 12, p. 422, Fig. 1 [15.54]

3.20 *Journal of Cell Science*

The Company ofBiologists Limited, Cambridge.

Grinnell, F (1992) 101, p. 3, Fig. 1 [15.57]

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

3.21 *Journal of Structural Biology*

Academic Press, Orlando.

Steinert, P.M.(1991) 107, p.187, Fig. 10 [15.45]

3.22 *BioEssays*

Wiley-Liss Inc.N.Y., NewYork.

Pruss, D., Hayes, J.J & Wolffe, A.P. (1995), 17, p.163, Fig. 2 [3.12B]

3.23 *Trends in Biochemical Sciences*

Elsevier/North Holland, Amsterdam, reprinted with permission from the publisher. Schwabe, J.WR. & Rhodes, D. (1991) 16, p.292, Fig. 1 [3.71]

Lane, D.P. & Hall, P.A.(1997) 22, p. 373, Fig. 2 [16.4]

3.24 *Advances in Protein Chemistry*

Academic Press, New York.

Carter D.C. & Ho, J.X. (1994) 45, p. 195, Fig. 21 [5.3]

3.25 *International Review in Experimental Pathology*

Academic Press, New York.

Arends, M.J. & Wyllie, A.H. (1991), 32, p. 223, Fig. 1 [16.1]

3.26 *Current Opinion in Cell Biology*

Current Biology Ltd, London.

Streuli, M. (1996) 8, p. 183, Fig. 1 [6.28]

Viel, A. & Branton, D. (1996) 8, p. 52, Fig. 5 [15.39]

3.27 *Biochemical Society Transactions*

Portand Press, London, reprinted with permission of the Biochemical Society.

Printz, R.L., Osawa, H., Ardehali, H., Koch, S. & Granner, D.K. (1997) 25, p. 109, Fig. 11 [6.39]

Holness, M.J., Fryer, L.G.D. & Sugden, M.C. (1997) 25, p. 2, Fig. 1 [13.3]

3.28 *Biochemical Journal*

Portland Press, London, reprinted with permission of the Biochemical Journal.

Iynedjian, P.B. (1993) 293, p. 232, Fig. 1 [6.40], p. 239, Fig. 4 [13.12]

Hufton, S.E., Jennings, I.G. & Cotton, R.G.H. (1995) 311, p. 359, Fig. 4 [8.20]

3.29 *FASEB Journal*

The Federation of American Societies for Experimental Biology.

Chiang, P.K., Gordon, R.K., Tal, J., Zeng, G.C., Doctor, B.P., Pardhasaradhi K. & Mc Cann, P.P. (1996) 10, p.472, Fig. 1 [8.16]

Patel, M.S. & Harris, R.A. (1995) 9, p. 1166, Fig. 3 [13.17]

3.30 *Advances in Genetics*

Academic Press, NewYork.

Eisensmith, R.C. & Woo, S.L.C. (1995) 32, p. 201, Fig. 6.1 [8.19]

3.31 *Biochimica et Biophysica Acta*

Elsevier Science, Amsterdam, reprinted with permission from the publisher.

Walker, J.E. (1995) 1271, p.225, Fig. 2 [9.25]

Singer, T.P., Ramsay, R.R.&Ackrell, B.A.C. (1995) 1271, p. 212, Fig. 1 [9.26]

Meister, A. (1995) 1271, p.37, Fig. 2 [9.40], p.40, Fig. 9 [9.39]

BCU IAȘI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

3.32 *Journal of Nutrition*

American Institute of Nutrition.

Gray, G.M. (1992) 122, p.173, Fig. 1 [11.4]

Gurney, A.L., Park, E.A., Liu, J., Giralt, M., McGrane, M.M., Patel, Y.M., Nizielski, S.E., Savon, S. & Hansoll, R.W (1994) 124, p. 1535S, Fig. 1 [13.14], p. 1536S, Fig. 2 [13.15]

3.33 *Nature, London*

Macmillan, London.

Goldstein, J.L. & Brown, M.S. (1990) 343, p. 425, Fig. 1 [13.21], p. 427, Fig. 3 [13.22] (Reprinted with permission from NATURE. © (1990) Macmillan Magazines Limited).

3.34 *Journal of Diabetes and its Complications*

Elsevier Science, reprinted with permission from the publisher.

Kahn, C.R. & Goldfine, A.B. (1993) 7, p. 93, Fig. 1 [15.13], p. 95, Fig. 2 [15.12], p.97, Fig. 4 [15.14]

3.35 *EMBO Journal*

Oxford University Press, Oxford.

Smith, CJ., Grigorieff, N. & Pearse, M.F. (1998) 17, p. 4946, Fig. 5 [15.38]

3.36 *FEBS Letters*

Elsevier Science, B. V., Amsterdam.

Heldin, C-H. (1997) 410, p. 18, Fig. 1 [15.33]; Cohen, P., Alessi, D.R. & Cross, A.E. (1997) 410, p. 5, Fig. 4 [13.4]

3.37 *Gastroenterology*

W.B. Saunders, Orlando.

Love, M.E. (1994) 107, p. 1538, Fig. 3 [11.5]

4. Lucrări publicate în reviste

4.1 *Journal of Molecular Biology*

Academic Press, London.

Josephs, R., Jarosch, H.S. & Edelstein, SJ. (1976) 102, p. 409, Fig. 6d [4.12]

Sigler, P.B., Blow, D.M., Matthews, B.W & Henderson, R. (1968) 35, p. 143, Fig. 6 [6.5]

Rich, A.(1961) 3, p. 483, Fig. 2 [5.10]

4.2 *Biochemical Education*

International Union of Biochemistry and Pergamon Press, Oxford.

Hall, L. & Campbell, P. N. (1979) 7, p. 57 [3.58,3.86]

Henderson, J.F. (1979) 7, p. 52, Fig. 2 [6.59]

Smith, I.(1980) 8, p. 1 [3.41]

4.3 *Science*

American Association for the Advancement of Science.

Britten, R.J. & Kohne, D.E. (1968) 161, p. 530, Figs 1, 2 [3.9, 3.10]

Baulieu, E.-E. (1989) 245, p. 1352, Fig. 2 [3.72]

4.4 *Cell*

MIT Press, Cambridge, MA.

Lai, E.C., *et al.* (1979) 18, p. 834, Fig. 6 [3.57]

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

4.5 *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*,
The National Academy of Sciences, Washington, DC.
Palade, G.E. (1964) 52, p. 617, Fig. 2 [9.18]
Siverton, E.L. (1977) 74, p. 5142, Fig. 3 [5.15]

4.6 *Philosophical Transactions of the Royal Society B*,
The Royal Society, London.
Evans, P.R., Farrants, G. W & Hudson, P.J. (1981) 293, p. 53, Fig. 2B [6.34]

4.7 *Journal of Cell Biology*
The Rockefeller University Press, New York.
Fernandez-Moran, H., Oda, T., Blair, P.V: & Green, D.E. (1964) 22, p. 73, Fig. 6,7 [9.30]
Alexander, C.A., Hamilton, R.L. & Havel, RJ. (1976) 69, p. 260, Fig. 14 [11.21]
Osborn, M., Webster, R.E. & Weber, K. (1978) 77, R.29 [15.43]

4.8 *Nature, London,*
Macmillan, London.
Arnone, A. (1972) 237, p.148 [4.15]
Poorman, R.A. et al (1984) 309, p. 468 [6.33]
Ungewickell, E. & Branton, D. (1981) 289, p. 420, Fig. 3 [15.38]
Barford, D. & Johnson, L.N. (1989) 340, p. 609, Fig. 1 [10.9]
Benesch, R. & Benesch, R. (1969) 221, pp. 618-622 [4.19]

4.9 *Biochemical Journal*
The Biochemical Society.
Andrews, P. (1964) 91, p.222 [2.17]

4.10 *Journal of Biological Chemistry*
American Society of Biological Chemists.
Rosenberg, L., Hellmann, W & Kleinschmidt, A.K. (1975) 250, p. 1877, Fig. 1 [7.11]
Trumpower, B.L. (1990) 265, p. 11410, Fig. 1 [9.27]

4.11 *ImmunologyToday*
Elsevier, North Holland, Amsterdam.
Brodsky, F.M. (1984) 5, p. 350, Fig. 4 [15.37]

4.12 *Medecine Sciences*
CDR Centrale des Revues/John Libby Eurotext, Montrouge.
Hue, L. & Rider, M.H. 3, p. 569, Fig. 2 [13.9]

4.13 *Cell Motility and the Cytoskeleton*
Alan R. Liss, New York.
Lawson, D. (1987) 7, p. 371, Fig. 2 [15.40]

4.14 *The Plant Journal*
Blackwell Science, Oxford.
Traas, J.A., Beven, A.F, Doonan, J.H., Cordewener, J. & Shaw, P.J. (1992) 2, p.729, Fig. 6 [5.26]

4.15 *Nature, London*
Macmillan, London.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Raff, M. (1998) 396, p. 119, Fig. 1 [16.2]

Clurman, B. & Groudine, M. (1997) 389, p.123, Fig. 1 [16.3] (Reprinted with permission from NATURE, © Macmillan Magazines Limited)

4.16 *Science*

American Association for the Advancement of Science.

Editorial (1997) 276, p. 701 „Tree of Life"

4.17 *Biochemistry*

The American Chemical Society.

Joshi, A.K., Witkowski, A. & Smith, S. (1998) 37, p. 2522, Fig. 4 [11.15]

4.18 *American Journal of Human Genetics*

The University of Chicago Press, Chicago.

Sinden, R.R. (1999) 64, p. 347, Tabel 1 [Tabel 3.7]

5. Mulțumiri personale

Dorim să mulțumim următoarelor personalități pentru oferirea figurilor indicate sau pentru permisiunea de a utiliza figuri pregătite în prealabil.

5.9 Professor R. Carrell, Cambridge Institute for Medical Research, University of Cambridge [5.4, 5.5]

5.15 Dr D.F. Steiner, Howard Hughes Medical Institute, University of Chicago [3.40, 3.41]

5.17 Professor K.R. Harrap, Cancer Research Campaign Laboratories, Sutton [3.25]

5.19 Professor J.S. Hyams, Department of Biology, University College London [3.14]

5.20 Dr.T.R. Dafforn, Cambridge Institute for Medical Research, University of Cambridge [4.1, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 4.23]

5.21 Dr. E. Hounsell & Mr D. Renouf, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University College London [14.28]

De asemenea, sunt adresate mulțumiri Prof. E.D. Saggerson, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University College London and Prof. F.Vella, Department of Biochemistry, University of Saskatchewan, Saskatoon, pentru comentariile deosebit de utile. Cartea *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology,* unde am contribuit și noi ca și editori, s-a dovedit o sursă valoroasă de informație și nomenclatură. Pentru denumiri științifice au fost adaptate recomandările IUPAC și IUBMB.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Sursa figurilor

TABEL cu corespondența dintre numărul figurilor și sursa lor

Fig.	Ref.	Fig.	Ref.	Fig.	Ref.
1.3	2.19	3.69	2.26	5.27	1.4
1.4	2.19	3.70	1.13	5.28	1.4
1.5	2.19	3.71	3.23	5.29	1.13
1.6	2.19	3.72	4.3	5.30	1.13
1.7	2.19	3.73	3.1	5.31	1.4
1.8	1.11	3.75	2.10	5.32	1.4
1.10	2.2	3.76	3.2	5.33	1.4
2.1 (Tabel)	1.1	3.77	3.11	5.34	1.13
2.5	1.1	3.82	1.7	5.35	1.13
2.6	1.1	3.83	1.7	6.5	4.1
2.7	1.1	3.85	3.11	6.8	2.3
2.8	1.3	3.86	4.2	6.9	2.3
2.12	1.1	3.87	2.13	6.10	2.3
2.13	1.10	3.88	2.13	6.16	1.7
2.15	1.1	3.89	2.23	6.22	2.25
2.17	4.9	4.1	5.20	6.23	2.25
2.18	2.17	4.2	1.1	6.24	2.25
2.18	2.18	4.4	2.24	6.25	3.10
2.23	2.1	4.5	5.20	6.26	3.10
2.24	1.3	4.6	5.20	6.28	3.26
3.5	1.5	4.7	5.20	6.30	3.6
3.7 (Tabel)	4.18	4.8	5.20	6.31	1.3
3.9	4.3	4.9	5.20	6.32	1.2
3.10	4.3	4.11	3.8	6.33	4.8
3.11	2.14	4.12	4.1	6.34	4.6
3.12A	2.11	4.15	4.8	6.35	2.20
3.12B	3.22	4.15	1.3	6.39	3.27
3.14	5.19	4.16	1.3	6.41	1.1
3.19	1.1	4.17	1.3	6.45	3.4
3.22	2.7	4.18	1.3	6.46	2.3
3.25	5.17	4.19	4.8	6.48	1.2
3.26	2.15	4.20	3.14	6.59	4.2
3.27	1.16	4.21	3.9	7.11	4.10
3.31	1.3	4.22	3.15	8.16	3.29
3.32	1.5	4.22	2.14	8.19	3.30
3.33	3.11	4.23	5.20	8.20	3.28
3.34	2.8	4.24	3.17	8.22	2.5
3.40	5.15	4.25	3.5	9.18	4.5
3.41	4.2	4.26	3.5	9.18	2.9
3.41	5.15	5.2	2.18	9.22	2.6
3.43	1.1	5.3	3.24	9.25	3.31
3.48	1.1	5.4	5.9	9.26	3.31
3.51	1.1	5.5	5.9	9.27	4.10
3.52	2.21	5.9	2.14	9.30	4.7
3.53	2.21	5.10	4.1	9.33	1.2
3.54	1.1	5.11	1.14	9.34	1.2
3.55	2.8	5.12	1.14	9.39	3.31
3.57	4.4	5.13	1.14	9.40	3.31
3.58	4.2	5.14	3.3	10.9	4.8
3.59	1.3	5.15	4.5	11.4	3.32
3.60	1.12	5.16	3.7	11.5	3.37
3.62	3.5	5.17	2.12	11.15	4.17
3.63	2.10	5.18	1.15	11.21	4.7
3.64	2.4	5.19	1.15	12.13	3.12
3.65	1.3	5.20	1.8	13.3	3.27
3.66	2.22	5.21	2.14	13.4	3.36

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig.	Ref.	Fig.	Ref.	Fig.	Ref.
3.67	2.21	5.22	2.16	13.9	4.12
3.68	2.22	5.26	4.14	13.10	1.6
13.12	3.28	15.12	3.34	15.44	3.10
13.14	3.32	15.13	3.34	15.45	3.21
13.15	3.32	15.14	3.34	15.48	3.12
13.16	1.6	15.15	3.17	15.49	3.12
13.17	3.29	15.18	2.20	15.52	1.9
13.19	3.16	15.24	3.10	15.53	3.10
13.21	3.33	15.33	3.36	15.54	3.19
13.22	3.33	15.35	3.18	15.56	3.5
14.19	3.13	15.37	4.11	15.57	3.20
14.28	5.21	15.38	4.8	16.1	3.25
15.5	3.12	15.38	3.35	16.2	4.15
15.6	3.7	15.39	3.26	16.3	4.15
15.7	3.10	15.40	4.13	16.4	3.23
15.10	3.11	15.41	2.11	Arborele vieții	4.16
15.10	3.11	15.42	2.11		
15.11	3.10	15.43	4.7		

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cuprins

Cap. 1. Bazele celulare ale biochimiei 1

Tipuri de celule vii 2
Structura celulelor procariote şi eucariote 2
Endocitoza şi exocitoza prin membrana plasmatică 2
Nucleul 2
Mitocondriile 3
Lizozomii 3
Peroxizomii 3
Reticulul endoplasmic 3
Citoscheletul 3
Fracţionarea subcelulară 4
Fracţiunea microzomală 4
Enzime marker 5
Funcţiile metabolice ale organitelor 5

Cap. 2. O introducere în studiul proteinelor şi peptidelor 7

Rolul aminoacizilor în celulă 8
Structura aminoacizilor 8
Asimetria în biochimie 9
Asimetria non-chirală 9
Proprietăţile ionice ale aminoacizilor 9
Structura peptidelor şi legătura peptidică 10
Proprietăţile ionice ale peptidelor 11
Purificarea proteinelor şi determinarea masei moleculare relative 12
Metode folosite pentru determinarea secvenţei aminoacizilor din proteine 13
Organizarea structurală a proteinelor 14
Denaturarea şi renaturarea proteinelor 15
Peptidele – structură şi activitate biologică 16

Cap. 3. Acizii nucleici şi sinteza proteinelor 17

Introducere: replicarea, transcrierea şi traducerea 18
Structura acizilor nucleici şi sinteza lor 18
Biosinteza proteinelor: traducerea 30
Biologia moleculară a celulei 42
ADN recombinant (inginerie genetică) 45

Cap. 4. Structura şi funcţiile proteinelor având hemoglobina drept exemplu 51

Proprietăţile proteinelor 52
Plierea proteinelor globulare 52
Structura şi proprietăţile mioglobinei şi ale hemoglobinei 53
Principii generale ale plierii proteinelor 57

BCU "ASENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cap. 5. Proteine: funcții specializate 61

Proteine plasmatice 62
Colagenul 65
Sistemul imunitar și imunoglobulinele 65
Proteinele motoarelor moleculare 70

Cap. 6. Structura și funcțiile enzimelor 75

Proprietățile enzimelor 76
Cinetica enzimatică 78
Reglarea și controlul metabolic 81
Fosforilarea și defosforilarea enzimelor 82
Mesageri secundari 85
Proprietățile alosterice ale enzimelor 85
Analiza controlului metabolic 87
Diversitatea genetică a enzimelor 88
Coenzimele și vitaminele hidrosolubile 92

Cap. 7. Structura glucidelor și interconversiile lor 99

Monoglucide și diglucide 100
Poliglucide 102
Interconversiile monoglucidelor 103

Cap. 8. Metabolismul azotului 105

Catabolismul proteinelor și eliminarea azotului 106
Rezerva de aminoacizi 108
Catabolismul aminoacizilor esențiali și formarea adrenalinei, histaminei, tiroxinei și a serotoninei 110
Biosinteza și metabolismul hemului 115

Cap. 9. Catabolismul oxidativ al glucozei și al acizilor grași 119

β-Oxidarea și glicoliza 120
Ciclul acidului citric 123
Lanțul transportor de electroni 124
Fosforilarea oxidativă 128
Alte procese mitocondriale 130

Cap. 10. Metabolismul glucidelor și al lipidelor în repausul alimentar 133

Metabolismul în repausul alimentar 134
Glicogenul și degradarea sa 134
Gluconeogeneza 136
Formarea și utilizarea corpilor cetonici 137
Controlul concentrației glucozei sanguine în stări normale și patologice 138

Cap. 11. Metabolismul glucidelor și al lipidelor în procese de absorbție 141

Procesul de absorbție 142
Glicogenogeneza 144
Lipogeneza 145

BCU - SIC CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cap. 12. Lipoproteinele plasmatice, metabolismul colesterolului și ateroscleroza 151

Lipoproteinele plasmatice și metabolismul colesterolului 152
Nivelul ridicat al lipidelor sanguine și ateroscleroza 157

Cap. 13. Acțiunea hormonilor și a altor efectori în reglarea metabolismului glicogenului, glucozei, cetogenezei și lipogenezei 161

Interacțiuni sistemice 162
Reglarea metabolismului glicogenului 162
Reglarea glicolizei și a gluconeogenezei 164
Reglarea metabolismului lipidic 167

Cap. 14. Fosfolipide, alte lipide și glucide complexe 171

Fosfolipide 172
Vitamine liposolubile 174
Alți compuși lipidici 176
Glucide complexe 179

Cap. 15. Biomembrane, receptori și transmiterea semnalelor 183

Principii ale structurii membranare 184
Receptori de membrană 186
Proteine G 189
Sisteme de semnalizare celulară 191
Traficul de receptori 193
Citoscheletul 194
Transportul prin membrană 196
Adeziunea celulară 197

Cap. 16. Controlul creșterii și al morții celulare, procese de îmbătrânire 201

Introducere 202
Bioinformatica 202
Apoptoza 202
Controlul creșterii celulare 204
Oncogenele și cancerul 206

INDEX 207

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IAȘI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Bazele celulare ale biochimiei

1

S-au identificat trei tipuri de celule vii. Bacteriile ca şi procariote, celulele animale şi fungii (ciupercile) ca şi eucariote. Eucariotele sunt caracterizate prin prezenţa unui nucleu care include majoritatea ADN-ului celular şi prin prezenţa multor organite celulare delimitate de membrane. După definirea exocitozei şi a endocitozei, care sunt caracteristice eucariotelor, sunt descrise pe scurt structura nucleului, mitocondriilor, lizozomilor, peroxizomilor, a reticulului endoplasmatic şi a citoscheletului. Componentele subcelulare pot fi studiate cu ajutorul microscopiei electronice şi izolate prin centrifugare diferenţială după ruperea membranei plasmatice. Constituenţii morfologici ai fracţiunilor izolate pot fi identificaţi prin analiza acizilor nucleici şi a proteinelor şi prin prezenţa enzimelor marker. Este descris succint metabolismul general al celulelor specializate, subdivizat la nivelul organitelor, precum şi distribuţia activităţii metabolice în celulă.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

TIPURI DE CELULE VII

Se pot distinge trei familii de celule vii, şi anume *Bacteria*, *Eukarya* şi *Archea*. Arborele filogenetic al acestor familii şi descendenţii lor sunt prezentaţi în fig. 1.1. Cele mai vechi celule din punct de vedere evolutiv aparţin organismelor hipertermofile care sunt capabile să trăiască în condiţii de temperaturi foarte ridicate. Din punct de vedere structural şi al activităţii metabolice, bacteriile şi eucariotele diferă semnificativ. De obicei, bacteriile (*Bacteria*) sunt numite procariote, iar *Eukarya*, eucariote, în timp ce organismele *Archea* ocupă o poziţie intermediară mai apropiată de *Eukarya* decât de *Bacteria*. Se poate vedea din fig. 1.1. că animalele ocupă poziţii la vârful lanţului eucariotelor, nu departe de plante şi fungi (filum care include şi drojdiile). Prin mecanisme complexe, animalele sunt protejate de invazia bacteriilor şi a altor eucariote. Nu se cunosc cazuri în care membrii familiei *Archea* invadează animalele şi de aceea în această carte va fi tratată numai biochimia eucariotelor, reprezentată prin organismele superioare şi a procariotelor, care determină boli la rasa umană.

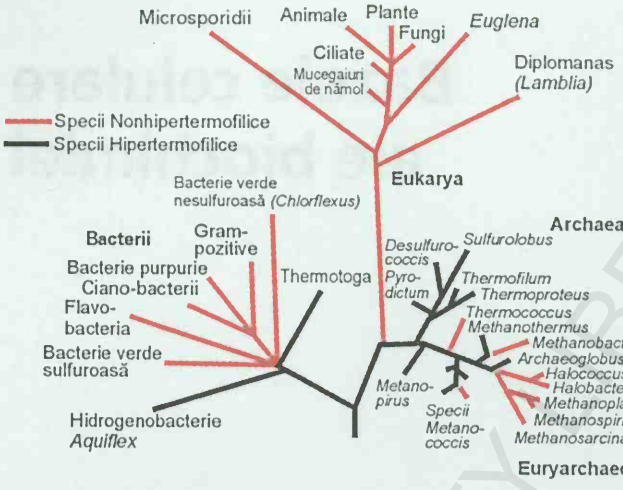


Fig. 1.1. Arborele vieţii. Familia arborelui Woese arată că viaţa este reprezentată în majoritate de fiinţele unicelulare, cele mai vechi celule fiind cele hipertermofile.

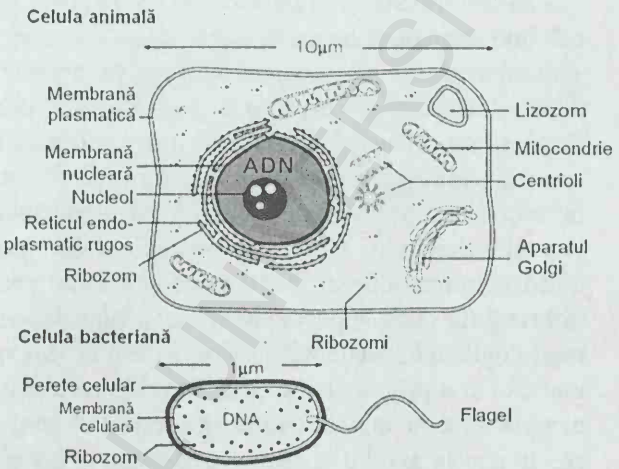


Fig. 1.2. Comparaţie între structura celulară la eucariote (de ex. o celulă animală) şi procariote (de ex. o celulă bacteriană).

STRUCTURA CELULELOR PROCARIOTE ŞI EUCARIOTE

Fig. 1.2. arată câteva caracteristici structurale majore ale celor două tipuri de celule. Se poate observa că molecula de ADN la eucariote este înconjurată de membrana nucleară, care nu este prezentă la procariote. Partea ne-nucleară a celulelor eucariote este cunoscută ca citoplasmă, deşi termenul este folosit adesea pentru a desemna tot ce este în afara nucleului şi a mitocondriilor. Partea din celulă unde nu se pot detecta componente organizate se numeşte citosol. Acest termen este legat de descrierea celulei intacte şi nu trebuie confundat cu fracţiunea solubilă care rezultă ca fază superioară (supernatant) prin centrifugarea celulelor dezagregate. La procariote cromozomii sunt circulari, în contrast cu cromozomii liniari ai eucariotelor. Citoplasma nu este diferenţiată la procariote, în timp ce la eucariote conţine diferite organite delimitate de membrane, cum sunt mitocondriile (şi cloroplastele din plante), lizozomii, peroxizomii şi aparatul Golgi. Procariotele sunt protejate prin perete celular, care este mult mai rigid decât membrana plasmatică a celulei animale. La procariote, reproducerea se face prin diviziune binară, la eucariote prin mitoză.

ENDOCITOZA ŞI EXOCITOZA PRIN MEMBRANA PLASMATICĂ

Endocitoza este procesul prin care celulele preiau macromolecule, particule sau în cazul unor tipuri celulare deosebite, preiau chiar alte celule. Materialul preluat este delimitat de membrana plasmatică care se invaginează şi îl comprimă formând o veziculă intracelulară, aşa cum se vede în fig. 1.3. Dacă materialul ingerat este fluid, procesul se numeşte pinocitoză („cellular drinking"), termenul de fagocitoză („cellular eating") este folosit pentru particule mari ingerate (resturi celulare sau microorganisme). Acest ultim proces implică formarea de fagozomi. Procesul invers se numeşte exocitoză. Aceste procese sunt specifice eucariotelor şi nu se întâlnesc la procariote.

Fig. 1.3. Procesul de exocitoză (secreţie) şi endocitoză (preluare).

NUCLEUL

Nucleul eucariotelor conţine ADN organizat în cromozomi separaţi. (Mitocondriile conţin de asemenea cantităţi mici de ADN, cunoscut ca ADN necromozomal). Într-o celulă diploidă umană sunt 23 de perechi de cromozomi care dau un număr diploid de 46 şi un număr înjumătăţit, 23, în celule haploide. Celulele cu un complement de ADN mai mare decât cel normal sunt poliploide dacă conţin mai mulţi cromozomi decât numărul standard. Nucleolul este o regiune în nucleu, aşa cum se vede în fig. 1.4., în care sunt localizate genele corespunzătoare pentru 3 molecule de ARN ribozomal. Membrana nucleară este dublă, cu un spaţiu perinuclear. Transferul substanţelor între citoplasmă şi nucleu se face prin porul nuclear, un complex de proteine în formă octogonală, cu orificiu central. Proteinele sintetizate în citoplasmă (vezi pag. 44) se

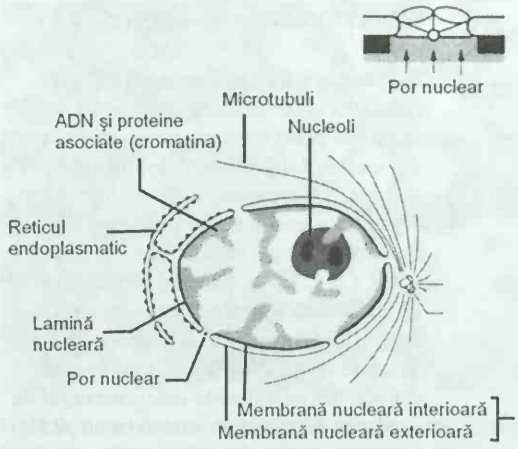


Fig. 1.4. Structura fină a nucleului la eucariote.

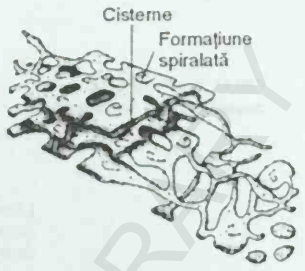


Fig. 1.6. Arhitectura reticulului endoplasmic.

deplasează în nucleu, în timp ce ARN sintetizat în nucleu se deplasează în citoplasmă. Lamina nucleară este structura care „tapetează" membrana nucleară internă şi este formată din trei proteine, lamininele A, B şi C. Lamina nucleară interconectează cromozomii.

MITOCONDRIILE

Mitocondriile sunt organite unice din citoplasmă şi nu au conexiune directă cu alte organite. Deşi conţin molecule de ADN, care se exprimă prin sinteza unor proteine mitocondriale, majoritatea proteinelor sunt importate din citoplasmă (vezi pag.44). Pe lângă faptul că sunt sursă majoră de ATP (AdenozinTriFosfat) produs prin lanţul respirator, mitocondriile sunt implicate, de asemenea, în catabolismul acizilor graşi şi contribuie la controlul nivelului de calciu din citoplasmă.

Membranele mitocondriale sunt de aproximativ 6,5 nm grosime, cu membrana internă pliată formând creste mitocondriale („cristae") care cresc substanţial suprafaţa acesteia. Faţa internă a crestelor este „tapetată" strâns cu particule cu diametrul de 8,5 nm, locul fosforilării oxidative (vezi pag. 129). Partea centrală a organitului este cunoscută sub numele de matrice mitocondrială. Caracteristicile majore ale structurii mitocondriilor sunt prezentate în fig. 1.5.

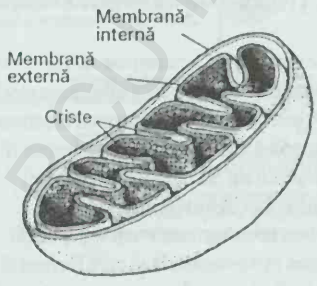


Fig.1.5. Structura mitocondriei.

LIZOZOMII

Lizozomii sunt vezicule cu membrane proprii ce conţin o gamă largă de enzime hidrolitice care scindează diverse tipuri de macromolecule. Ei sunt importanţi în sistemul digestiv intracelular, astfel încât, spre exemplu, substanţe şi componente celulare care trebuie degradate formează fagozomi care fuzionează cu lizozomii pentru a da naştere lizozomilor secundari (vezi pag. 45).

PEROXIZOMII

Aceste organite au fost denumite iniţial microcorpusculi („microbodies"). Conţin predominant 3 enzime, catalaza, uratoxidaza şi D-aminoacidoxidaza şi sunt înconjuraţi de o singură membrană. Sunt importanţi în eliminarea apei oxigenate produse prin oxidarea acizilor graşi şi prin oxidarea radicalilor liberi (specii reactive ale oxigenului).

RETICULUL ENDOPLASMATIC

Reticulul endoplasmatic este o reţea de membrane răspândită în toată citoplasma. Aceste membrane formează o reţea complexă de vezicule, tuburi sau saci plaţi conectaţi între ei. Membranele sunt paralele între ele, formând canale numite cisterne. Interiorul cisternelor este numit lumen şi conţine proteine luminale. Se creează astfel arii membranare largi, aria suprafeţelor reticulului endoplasmatic creat de aceste membrane fiind de 11 m² într-un ml de citoplasmă. Suprafaţa aceasta poate să includă ribozomi (reticul endoplasmatic rugos, RER) sau nu (reticul endoplasmatic neted, SER). Ribozomii reprezintă sediul sintezei proteice (vezi p. 34). RER este sediul sintezei proteinelor de secreţie (vezi p. 42), în timp ce SER este important ca sediu al sintezei lipidelor complexe (vezi p. 172). Arhitectura reticulului endoplasmatic este prezentată în fig. 1.6.

CITOSCHELETUL

Înalta rezoluţie obţinută cu microscopul electronic arată că există o reţea structurată chiar şi la nivelul citosolului. Reţeaua este compusă din 3 tipuri de filamente: microfilamente care sunt multimeri ai actinei (vezi p. 72), microtubuli care sunt multimeri ai tubulinei (vezi p. 73) şi un grup heterogen numit filamente intermediare (vezi p. 73). Prelungirile suprafeţei celulare sunt susţinute de regulă de către un miez („core") de microfilamente menite a produce o mărire a suprafeţei. Acest fenomen poate fi observat în fig. 1.7. care arată principalele caracteristici ale citoscheletului, exemplificat la o celulă cu microvili a intestinului subţire.

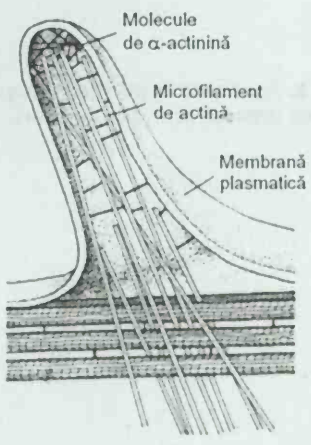


Fig.1.7. Componentele citoscheletului.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

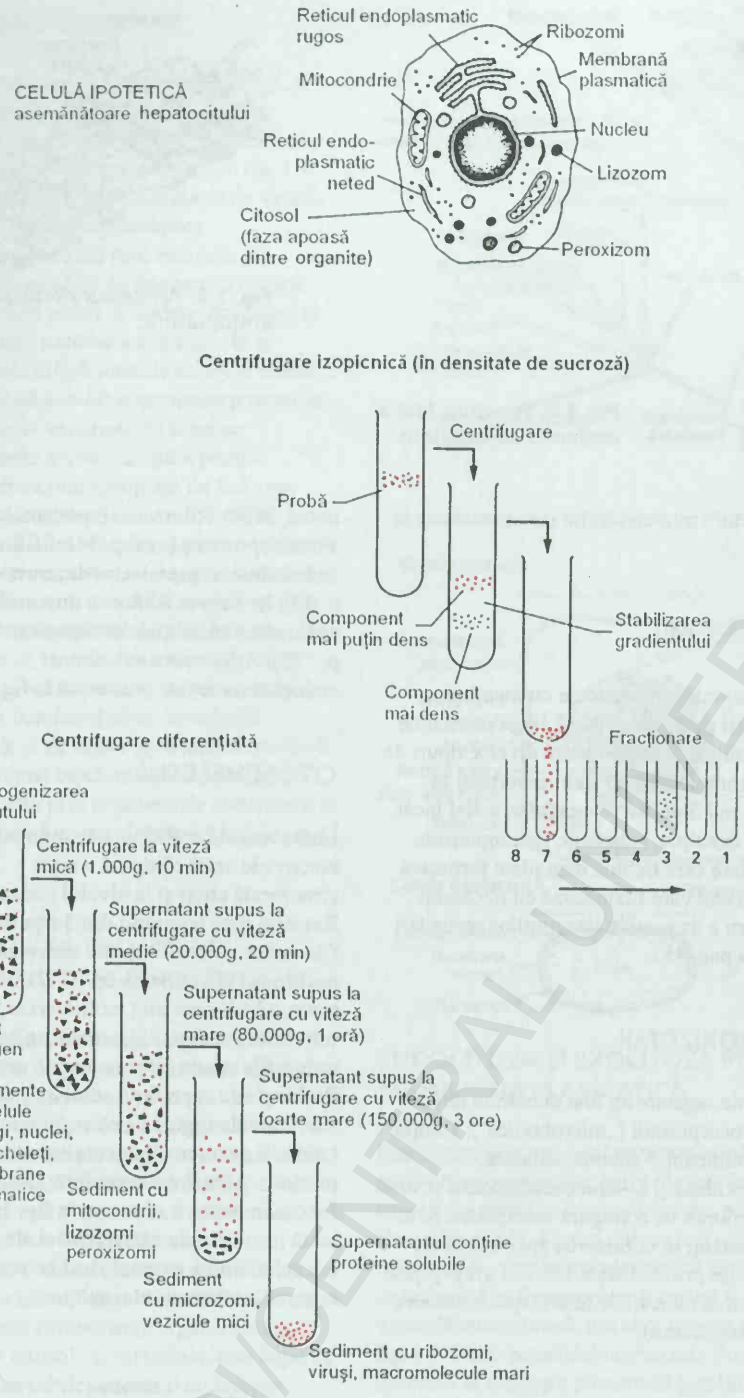


Fig. 1.8. Fracționarea prin centrifugare a componentelor morfologice din celule animale distruse prin omogenizare.

FRACȚIONAREA SUBCELULARĂ

Structura și activitatea metabolică a diferitelor organite conținute în celula eucariotă pot fi determinate pe diferite căi, dar metoda folosită uzual de biochimiști include dezagregarea structurii celulelor și separarea constituenților prin centrifugare. Principiile acestei metode sunt prezentate în fig. 1.8. Celulele sunt lizate cu atenție astfel încât să se evite distrugerea structurii organitelor. Se poate folosi omogenizatorul cu cuțite de tip Waring („Waring blendor"), dar mai des se folosește omogenizatorul de tip Potter, format dintr-un tub cu un pistil rotativ de sticlă mată sau din teflon. Produsul obținut astfel se numește „omogenat". Pentru a obține fracțiuni îmbogățite din diferite organite se pot folosi trei metode bazate pe diferențele de dimensiune și densitate dintre aceste fracțiuni. În centrifugarea diferențială, așa cum se vede în partea stângă a fig. 1.8., sedimentul obținut prin centrifugare („pellet") nu este omogen din punctul de vedere al constituenților morfologici întrucât omogenatul este inițial dispersat în tot tubul de centrifugă. Prin centrifugarea în gradient de densitate („isopycnic"), descrisă în partea dreaptă a fig. 1.8. omogenatul este depus inițial pe suprafața unui gradient de zaharoză (sucroză) care se centrifughează până se atinge echilibrul. Întrucât acest proces durează mult, se folosește uzual o metodă de compromis în care omogenatul este depus la suprafața gradientului de zaharoză, dar centrifugarea se face pe durată mai scurtă. În acest caz, rolul principal al gradientului este de a oferi stabilitatea, îndeosebi când trebuie colectat conținutul fracțiunilor din tubul de centrifugă.

Indiferent de metoda de separare trebuie reamintită dependența caracteristicilor morfologice ale sedimentului sau ale fracțiunilor în funcție de tipul țesutului studiat. Astfel, este esențial ca toate fracțiunile să fie examinate fie prin microscopie, fie prin analiza enzimelor marker (vezi mai jos).

FRACȚIUNEA MICROZOMALĂ

Ca un exemplu de separare a componentelor unei celule omogenizate, în fig. 1.9. este prezentată imaginea electronomicroscopică a fracțiunii microzomale din ficat de șobolan. Se definește de obicei fracțiunea microzomală ca fracțiunea celulară ce sedimentează mai încet decât fracțiunea mitocondrială și care formează particule distincte. Așa cum se poate vedea, sedimentul nu este nici pe departe omogen,

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

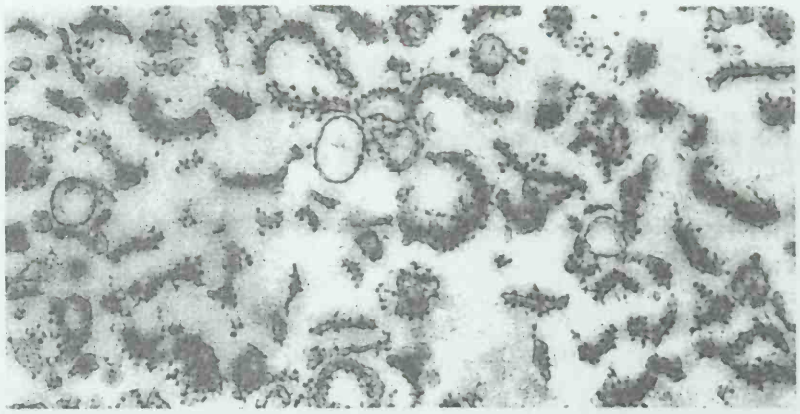


Fig.1.9. Constituenţi morfologici ai unor fracţiuni microzomale tipice din ficat, aşa cum se observă prin microscopie electronică.

dar este format predominant din fragmente de reticul endoplasmatic. Aşa cum s-a indicat mai sus, o fracţiune similară din alt ţesut poate conţine numai membrane lipsite de ribozomi.

ENZIME MARKER

Confirmarea existenţei constituenţilor morfologici ai diferitelor fracţiuni subcelulare se poate obţine prin analiză biochimică. Astfel, se pot determina raporturile ADN/proteină sau ARN/proteină. Analiza enzimatică este, de asemenea, utilă, având în vedere că de obicei (dar nu întotdeauna) o anume enzimă este asociată cu un anumit constituent morfologic al celulei şi că alocarea unei enzime unui anumit constituent celular este unică (de exemplu, considerând că toate mitocondriile sunt identice, foarte probabil adevărat). Aceste enzime specifice unui organit celular se numesc enzime marker. Exemple: glucozo-6-fosfataza pentru reticulul endoplasmatic din ficat, galactoziltransferaza pentru membranele aparatului Golgi (vezi p. 43) şi succinatdehidrogenaza pentru mitocondrii (vezi, de asemenea, p. 125).

FUNCŢIILE METABOLICE ALE ORGANITELOR

Deşi descrierea detaliată a metabolismului este dată în capitolele următoare, considerăm util în acest stadiu de a indica pe scurt cele mai importante caracteristici ale distribuţiei activităţii metabolice într-o celulă cum este hepatocitul. Acestea sunt ilustrate şi explicate în fig. 1.10.

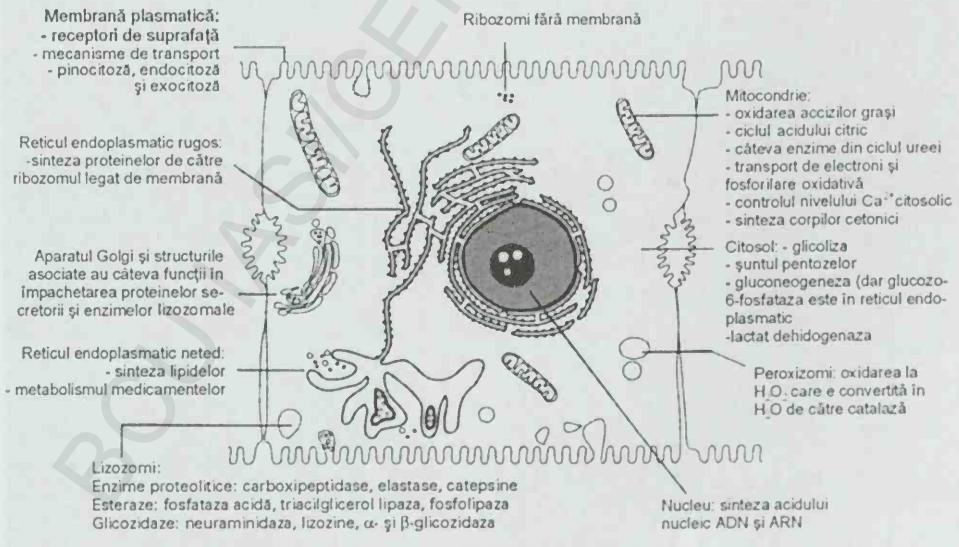


Fig.1.10. Funcţia metabolică a organitelor celulare într-o celulă animală.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

O introducere în studiul proteinelor și peptidelor

2

Componenta fundamentală a unei proteine este lanțul polipeptidic compus din resturi de aminoacizi, douăzeci dintre ei fiind implicați în sinteza proteinelor. Aceste resturi pot fi modificate după sinteza lanțului polipeptidic. Celelalte componente ale proteinelor se numesc grupări prostetice. Vor fi descrise, structura aminoacizilor și proprietățile lor caracteristice de molecule amfotere, urmate de o expunere despre asimetrie și chiralitate. Se va explica modul în care interacționează resturile de aminoacizi din cadrul proteinelor. Proprietățile ionice ale proteinelor intervin atât în cazul unor astfel de interacțiuni, cât și în separarea lor electroforetică. Proteinele pot fi separate, de asemenea, și pe baza dimensiunilor lor. După prezentarea modului în care poate fi determinată ordinea resturilor de aminoacizi din polipeptide, se va descrie pe scurt modul de organizare ierarhică a structurii proteice. Structura terțiară a proteinelor poate fi distrusă prin denaturare. În final, se va arăta cum și peptidele mici pot prezenta activitate biologică, de exemplu hormonii și mediatorii.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ROLUL AMINOACIZILOR ÎN CELULĂ

Aminoacizii sunt un exemplu foarte bun despre rolul multiplu pe care-l joacă constituenții celulari. Aminoacizii conțin, alături de alte grupări funcționale, două care sunt comune tuturor aminoacizilor: o grupare amino și una carboxil. Capacitatea unui aminoacid de a se condensa cu alți aminoacizi pentru a forma peptide este dependentă de proprietățile chimice ale acestor două grupări funcționale. Cu siguranță că cel mai important rol al aminoacizilor este cel de a servi ca subunități monomerice pentru proteine, dar ei au și alte roluri importante. De exemplu, glutationul, o tripeptidă cu funcții importante, alte peptide mici cu rol de hormoni, sau în unele organisme, rol de antibiotice. Acidul glutamic joacă rol de neuro-transmițător. Aminoacizii sunt precursorii unei largi varietăți de biomolecule (de exemplu arginina pentru oxidul de azot, histidina pentru histamină). Unii aminoacizi sunt metabolizați și utilizați pentru producerea de glucoză (gluconeogeneză). Deoarece nu există rezerve de aminoacizi, cu excepția celor implicați in structura proteinelor, atunci când gluconeogeneza are nevoie de aminoacizi, aceștia sunt eliberați prin descompunerea proteinelor.

STRUCTURA AMINOACIZILOR

Toți aminoacizii obișnuiți, cu excepția prolinei, posedă aceeași structură generală în sensul că atomul de carbon α- este legat de o grupare –COOH, de una $-NH_2$ și de un rest „R" răspunzător de proprietățile diferite ale diferiților aminoacizi. Formula generală a aminoacizilor este prezentată în fig. 2.1. Structurile celor 20 de aminoacizi uzual întâlniți în structura proteinelor sunt prezentate în fig. 2.2., grupate în funcție de natura catenelor laterale „R". Sunt indicate, de asemenea, pentru fiecare aminoacid și abrevierile de trei litere și, respectiv, de o literă, acceptate internațional.

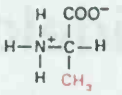
În toți aminoacizii α, cu excepția glicinei, carbonul α este optic activ. Izomerii posibili aparțin seriei D sau L. S-a constatat că toți izomerii existenți în mod natural în constituția proteinelor au configurația L (vezi p. 9).

O unitate de cistină este formată prin unirea a două cisteine prin intermediul unei

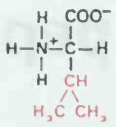
Fig. 2.1. Formula generală a unui aminoacid.

1. Aminoacizi nepolari sau hidrofobi

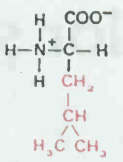
L-Alanina (Ala) A



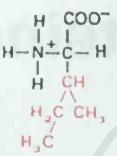
L-Valina (Val) V



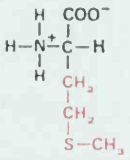
L-Leucina (Leu) L



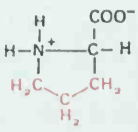
L-Isoleucina (Ile) I



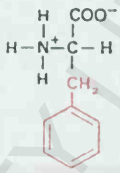
L-Metionina (Met) M



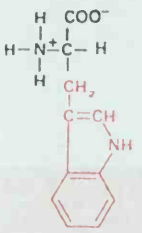
L-Prolina (Pro) P



L-Fenilalanina (Phe) F

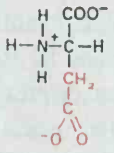


L-Triptofan (Trp) W

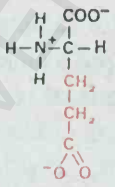


2. Aminoacizi încărcați negativ la pH 6-7

L-Acid aspartic (Asp) D

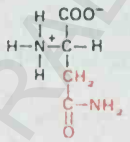


L-Acid glutamic (Glu) E

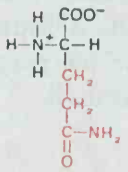


3. Aminoacizi neutri sau hidrofili

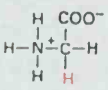
L-Asparagina (Asn) N



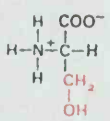
L-Glutamina (Gln) Q



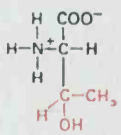
L-Glicina (Gly) G



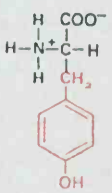
L-Serina (Ser) S



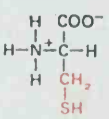
L-Treotina (Thr) T



L-Tirozina (Tyr) Y

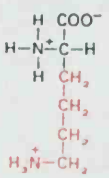


L-Cisteina (Cys) C

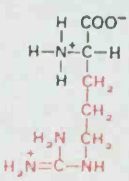


4. Aminoacizi încărcați pozitiv la pH 6-7

L-Lizina (Lys) K



L-Arginina (Arg) R



L-Histidina (His) H

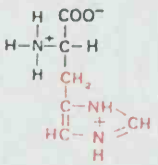


Fig. 2.2. Structurile celor 20 de aminoacizi comuni, grupați după natura radicalului R. A se observa și prescurtările de trei, respectiv o literă pentru fiecare aminoacid.

B.C.U. "M. EMINESCU" IAŞI

punţi disulfurice (-S-S-) formate din două grupări sulfhidrice (-SH).

Sarcinile apărute în formulele aminoacizilor din fig.2.2. sunt cele care apar la pH 6-7. Acizii se definesc ca donori de protoni şi bazele, acceptori de protoni. Ca urmare, la pH 6-7, un aminoacid clasificat în grupul 2 se va afla sub forma unei baze libere (un anion), iar unul clasificat în grupul 4 se va găsi sub forma unui acid liber (un cation). De aceea termeni ca „acid" sau „bazic" trebuie folosiţi cu precauţie pentru aminoacizi, având în vedere că ei se referă la formele protonate ale compuşilor din grupul 2, respectiv la formele neprotonate ale celor din grupul 4. Un compus cum este un aminoacid care posedă atât grupări bazice cât şi grupări acide se numeşte amfoter.

ASIMETRIA ÎN BIOCHIMIE

ASIMETRIA APLICATĂ CA EXEMPLU PENTRU AMINOACIZI

Chiralitatea derivă din cuvântul grecesc *cheir*, „mână". Mâna stângă şi cea dreaptă sunt imagini în oglindă ale uneia faţă de cealaltă. O astfel de asimetrie a structurii moleculare este de o importanţă foarte mare în biochimie. O moleculă chirală posedă cel puţin un centru de asimetrie, cum ar fi de exemplu un atom de carbon de care se leagă patru grupări diferite între ele.

Aminoacidul alanină, poate exista în două forme denumite D-alanină şi L-alanină, prezentate în fig. 2.3.

Aminoacizii conţinuţi în proteinele mamiferelor aparţin seriei L. Glucidele sunt de asemenea, molecule chirale, D-glucidele fiind predominante la mamifere (vezi p. 100). În fig. 2.3. atomii de oxigen ai grupărilor carboxil sunt de culoare roşie, atomii de azot ai grupărilor amino sunt gri, atomii de carbon, negri şi atomii de hidrogen, albi.

ASIMETRIA NON-CHIRALĂ

Chiar dacă o moleculă nu este chirală, ea poate conţine grupări funcţionale identice, dar steric diferite. O reprezentare simplificată a unei molecule ipotetice apare în fig. 2.4. Dacă A şi B sunt menţinute în spaţiu în acelaşi plan, atunci se poate face distincţia între grupările identice X_1 şi X_2. Acidul citric este exemplul biochimic clasic în acest sens. Deşi această moleculă posedă un plan de simetrie, gruparea carboxil centrală şi cea hidroxil pot fi menţinute astfel încât să se poată face distincţie între cele două grupări – CH_2COOH şi de aceea molecula poate interacţiona cu o enzimă ce are situsuri specifice de legare pentru diferite grupări din moleculă (vezi fig. 9.15, p. 124). O astfel de moleculă este numită „prochirală" în sensul că ea poate deveni chirală prin

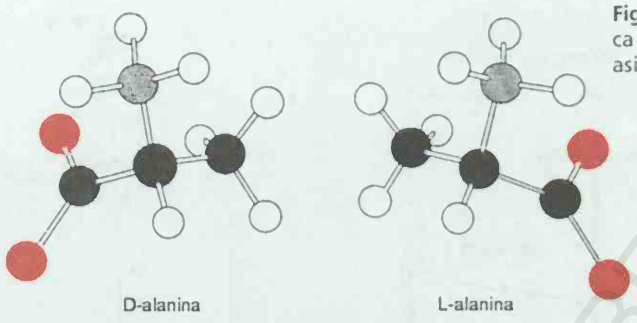


Fig.2.3. D- şi L-alanina, ca exemple de structuri asimetrice.

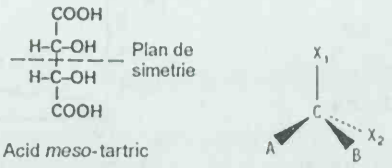


Fig. 2.4. Exemplu de compus *mezo* (stânga) şi reprezentarea simplă a unei molecule ipotetice (dreapta).

modificarea structurii unei singure grupări legate de atomul de carbon central. A se nota că, dacă o moleculă are un astfel de plan de simetrie încât centrele chirale situate de-o parte şi de alta a planului se compensează reciproc, atunci molecula se numeşte compus *mezo* (exemplu acidul *mezo*-tartric prezentat în fig. 2.4).

CONVENŢIA R şi S

Un centru chiral poate fi notat R sau S. Modul de atribuire a notaţiilor R sau S unui centru chiral se face astfel:

- se stabileşte ordinea de prioritate a grupărilor funcţionale (pe baza convenţiei ce ţine cont de masele moleculare ale atomilor direct legaţi de carbonul chiral). Ordinea de prioritate a unor grupări importante biochimic este: -SH (maximă), -OH, $-NH_2$, -COOH, -CHO, $-CH_3$, -H (minimă). Se orientează apoi molecula astfel încât gruparea cu prioritatea minimă să fie situată cât mai departe de privitor.
- dacă ordinea de prioritate a substituenţilor rămaşi descreşte (de la maxim spre minim) în sensul deplasării acelor de ceasornic, atunci centrul chiral are configuraţia R. Dacă ordinea de prioritate scade în sens invers deplasării acelor de ceasornic, centrul chiral va fi S. În aceste condiţii carbonul α al L-alaninei are configuraţia S.

PROPRIETĂŢILE IONICE ALE AMINOACIZILOR

SEPARAREA ELECTROFORETICĂ

Aşa cum s-a explicat deja, aminoacizii au proprietăţi amfoterice care permit separarea lor prin electroforeză la pH 6,0 când ei se deplasează într-un mediu suport (hârtie) sub acţiunea unei forţe datorate aplicării unui câmp electric exterior. O astfel de separare este ilustrată în fig.2.5. Electroforeza se desfăşoară în mod obişnuit pe hârtie, dar se pot folosi, de asemenea, şi diverse geluri. Caracterul amfoter al α-ami-noacizilor este demonstrat în absenţa altor acizi sau baze, când grupările carboxil şi cele amino sunt ambele complet ionizate, dând naştere amfiionilor [zwitterion, în germană *Zwitter*=hibrid). Această formă amfiionică predomină în soluţiile neutre şi în cristale, în raport cu forma neionizată.

CAPACITATEA DE TAMPONARE A AMINOACIZILOR

Aşa cum s-a explicat anterior, un acid este definit ca un donor de protoni. Capacitatea de disociere a acizilor diferă însă: acizii mai

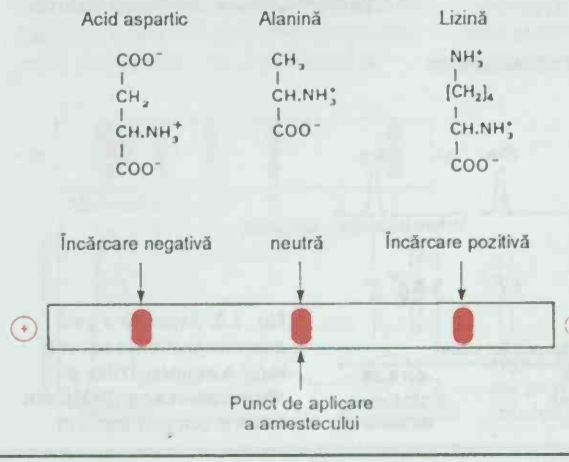


Fig. 2.5. Demonstrarea proprietăţilor ionice ale aminoacizilor prin electroforeză.

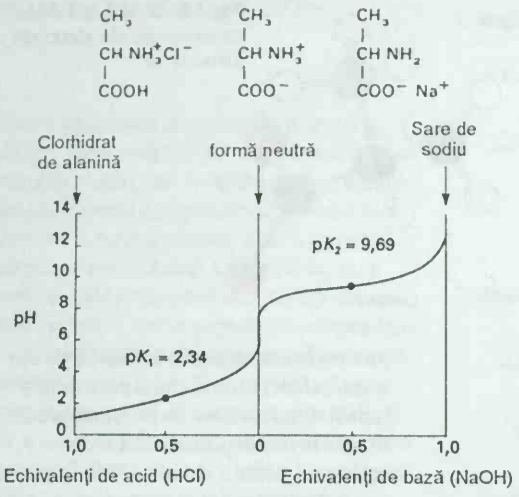


Fig. 2.6. Capacitatea de tamponare a aminoacizilor, așa cum se observă și din curba de titrare a alaninei.

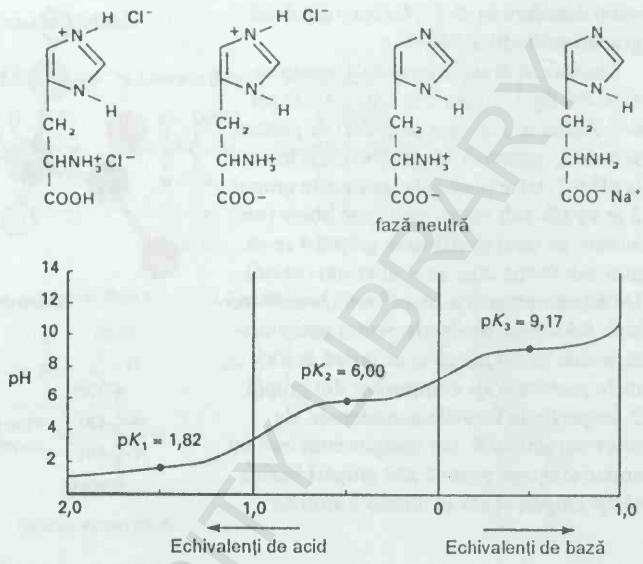


Fig. 2.7. Capacitățile de tamponare ale histidinei, cu o importanță fiziologică specială.

tari disociază mult mai bine decât o fac cei slabi. Tăria unui acid se exprimă prin mărimea pK_a, ce reprezintă pH-ul la care un acid este disociat în proporție de 50% (vezi p. 80). Curba de titrare a alaninei (fig. 2.6) arată că grupa –COOH devine tot mai mult disociată, pe măsură ce pH-ul crește. La pK_1, modificarea pH-ului soluției prin adaosul unor cantități crescute de NaOH este minimă; cu alte cuvinte capacitatea de tamponare este maximă. Bazele au fost definite ca acceptori de protoni; deci, în acest caz, procentul de NH_3 ionizat scade pe măsură ce pH-ul crește și capacitatea maximă de tamponare va fi la pK_2.

Capacitatea de tamponare a histidinei

Dacă radicalul R al unui aminoacid poate fi și el ionizat, atunci aminoacidul va avea un al treilea pK. Histidina este foarte importantă în această privință deoarece gruparea imidazolică este slab bazică, având un $pK_a = 6,00$. La pH-ul fiziologic de 7,2-7,4 ea există în soluție ca un amestec al formelor protonate și al celor disociate. Histidina va contribui astfel la capacitatea de tamponare a proteinelor. Curba de titrare a histidinei este prezentată în fig. 2.7.

SEPARAREA AMINOACIZILOR PRIN CROMATOGRAFIE DE SCHIMB IONIC

Deseori este important a se determina proporția diferiților aminoacizi, atât în fluidele biologice cum ar fi serul sau lichidul rahidian, cât și în hidrolizatele proteice. În acest scop, se poate folosi o rășină ce conține fie grupări încărcate pozitiv (rășină schimbătoare de anioni), fie grupări încărcate negativ (rășină schimbătoare de cationi). Aminoacizii dintr-un amestec, trecuți printr-o coloană umplută cu o astfel de rășină se vor lega competitiv de grupările încărcate cu sarcini (+) sau (-)ale rășinei.

Fig. 2.8. prezintă separarea aminoacizilor dintr-un hidrolizat peptidic, pe o coloană cu polistiren sulfonat (rășină schimbătoare de cationi). Eluția coloanei cu sisteme tampon având pH-uri succesiv crescătoare face ca acidul aspartic (având caracter acid) să părăsească primul coloana, iar arginina (bazică) ultima. Folosirea ninhidrinei pentru detecția aminoacizilor este uzuală; în urma reacției cu α-aminoacizii se obține o culoare albastră (sau galbenă în cazul prolinei), intensitatea culorii fiind în concordanță cu cantitatea de aminoacid prezentă în probă. Întregul proces de detecție poate fi automatizat.

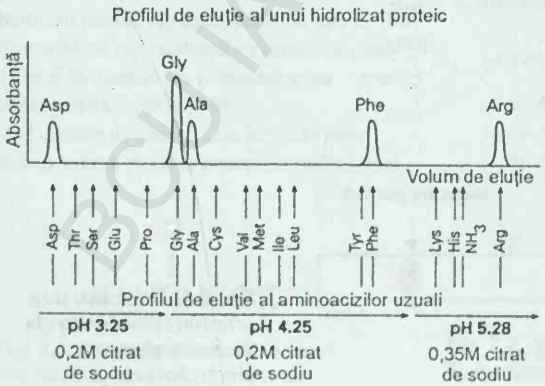


Fig. 2.8. Separarea prin cromatografie de schimb ionic a aminoacizilor și determinarea cantității din fiecare compus separat.

STRUCTURA PEPTIDELOR ȘI LEGĂTURA PEPTIDICĂ

LEGĂTURA PEPTIDICĂ

Legătura peptidică este formată prin reacția a doi aminoacizi, cu eliminarea apei între două grupări vecine $-NH_2$ și –COOH, așa cum este arătat în fig. 2.9.

Prolina poate și ea face parte dintr-o legătură peptidică (fig. 2.10), dar, spre deosebire de α-aminoacizi, nu va avea disponibil nici un atom de H pentru a forma legături de hidrogen care, așa cum se va vedea, sunt importante pentru structurile secundare ale proteinelor.

Legătura peptidică este o structură rigidă și acest fapt are implicații importante pentru structura proteinelor (vezi p. 52).

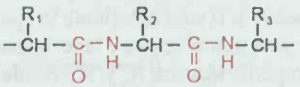


Fig.2.9. Formarea legăturilor peptidice prin interacțiunea aminoacizilor.

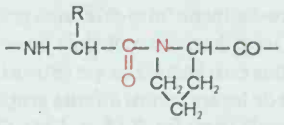


Fig. 2.10. Participarea prolinei într-o legătură peptidică.

H_2N–Tyr–Gly–Gly–Phe–Met–COOH
Encefalină

Fig. 2.11. Structura unei peptide tipice.

NOTAŢII FOLOSITE PENTRU PEPTIDE

Structura unei peptide tipice, encefalina, este prezentată în fig. 2.11. La scrierea structurii primare a unei peptide, se începe cu gruparea amino-(numită şi capăt N-terminal) şi se încheie cu gruparea carboxil (denumită capăt C-terminal). În fig. 2.11, encefalina este scrisă folosind codul de trei litere pentru aminoacizii constituenţi. Forma prescurtată scrisă conform codului de o literă, ar fi următoarea: YGGFM. O peptidă compusă din mai multe resturi de aminoacizi se numeşte o polipeptidă. Având în vedere că astfel de polipeptide constituie scheletul structural de bază al proteinelor, nu există o definiţie precisă care să facă trecerea de la polipeptide la proteine, dar când se vorbeşte despre insulină, constituită din 50 de resturi de aminoacizi, se face deseori referirea ca fiind un exemplu tipic pentru cea mai mică proteină.

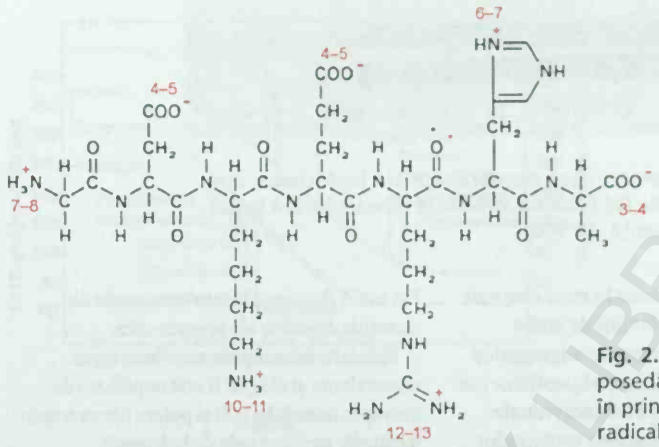
IDENTIFICAREA LEGĂTURILOR PEPTIDICE

Prezenţa unei legături peptidice este determinată de obicei prin reacţia biuretului. Biuretul are formula $NH_2CONHCONH_2$ şi este o substanţă simplă având o legătură peptidică. Când biuretul se tratează cu $CuSO_4$ în soluţie alcalină se produce culoarea purpurie. Aceasta este cunoscută sub numele de reacţia biuretului şi, aşa cum este de aşteptat, proteinele dau o intensă reacţie.

PROPRIETĂŢILE IONICE ALE PEPTIDELOR

NATURA CATENELOR LATERALE R ÎNCĂRCATE

Grupările ionizabile, α-amino şi α-carboxilice ale aminoacizilor sunt blocate prin formarea legăturilor peptidice, cu excepţia celor ale resturilor terminale. Forma ionizată a unei proteine va depinde de aceea aproape în totalitate de grupările funcţionale R-; acestea, fiind de fapt cele rămase pe acizii aspartic şi glutamic şi cele de pe lizină, arginină şi histidină. Acest lucru este ilustrat şi în fig. 2.12., care prezintă structura unei peptide ipotetice conţinând toate aceste grupări. Cifrele indică intervalul de pK la care disociază fiecare grupă. Aşa cum s-a arătat şi anterior, histidina este foarte importantă de vreme ce sarcina sa poate varia pe domeniul de pH fiziologic.



glicil-aspartil-lisil-glutamil-arginil-histidil-alanină

Fig. 2.12. Polipeptidele posedă proprietăţi ionice, în principal datorită radicalilor R ale resturilor de aminoacizi.

PUNCTELE IZOELECTRICE ALE PROTEINELOR

Punctul izoionic reprezintă pH-ul care rezultă când o proteină, liberă de orice alţi ioni, se dizolvă în apă. Punctul izoelectric este acel pH la care nu se produce migrarea în câmp electric (vezi mai jos) spre niciunul dintre electrozi. În tabelul 2.1 sunt prezentate punctele izoelectrice pentru o serie de proteine. Pe baza acestor valori, proteinele se consideră bazice, neutre sau acide, după cum încărcarea (sarcina) lor la pH-ul fiziologic este una pozitivă, aproximativ nulă sau negativă.

Tabelul 2.1. Punctele izoelectrice ale unor proteine des întâlnite

Proteina	Punctul izoelectric
Proteine din sânge	
α_1-Globulina	2,0
Haptoglobina	4,1
Albumina serică	4,7
γ_1-Globulina	5,8
Fibrinogenul	5,8
Hemoglobina	7,2
γ_2-Globulina	7,4
Proteine diverse	
Pepsina	1,0
Ovalbumina	4,6
Insulina	5,4
Histonele	7,5-11,0
Ribonucleaza	9,6
Citocromul c	9,8
Lizozimul	11,1

ELECTROFOREZA PROTEINELOR

Proteinele se pot separa prin electroforeză la fel ca şi aminoacizii. Fig. 2.13 prezintă rezultatele electroforezei pe un suport de acetat de celuloză a proteinelor din ser uman (hârtia poate fi şi ea folosită), într-un tampon la pH 8,6. Benzile corespunzătoare proteinelor separate, sunt vizualizate prin colorare cu un colorant specific şi printr-o scanare densitometrică se obţin indicaţii despre cantitatea relativă a proteinelor din fiecare bandă separată. Notaţia „S" indică locul de aplicare al probei de ser înainte de aplicarea câmpului electric cu polarităţile notate pe figură. Deşi mobilitatea proteinelor depinde în principal de sarcina electrică relativă a acestora, dimensiunile proteinelor joacă, de asemenea, un rol important şi aceasta contribuie desigur la poziţia benzii corespunzătoare voluminoasei molecule de γ-globulină. Deşi proteinele din ser dau impresia că sunt separate în benzi discrete, trebuie ţinut minte că, exceptând albumina serică, fiecare din celelalte benzi conţine numeroase proteine diferite.

ELECTROFOREZA PROTEINELOR ÎN GEL DE POLIACRILAMIDĂ (PAGE)

Gelul de poliacrilamidă se poate folosi în locul acetatului de celuloză sau al hârtiei pentru separarea proteinelor native.

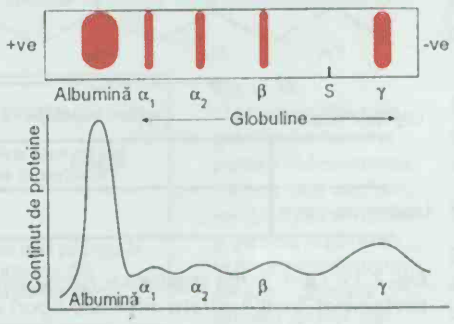


Fig. 2.13. Separarea proteinelor din ser prin electroforeză pe acetat de celuloză.

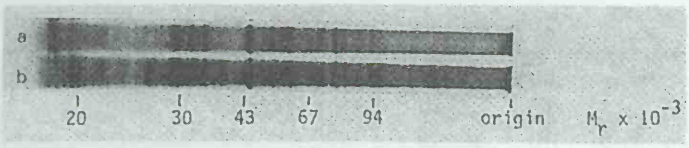


Fig. 2.14. Separarea proteinelor membranare ale limfocitelor din splină (a) şi din timocite (b) folosind SDS-PAGE (Electroforeză în gel de acrilamidă în prezenţă de SDS).

Un astfel de gel este folosit în mod obişnuit în prezenţa dodecil sulfatului de sodiu (SDS). În acest caz, proteinele oligomerice (alcătuite din câteva unităţi polipeptidice) se pot separa în subunităţile lor individuale.

Fig. 2.14 prezintă separarea proteinelor membranare prin metoda SDS-PAGE. Proteinele se suspendă într-o soluţie SDS 1%. Acest detergent desface majoritatea legăturilor dintre proteine şi dintre acestea şi lipide. Pentru a desface şi punţile disulfurice, se adaugă, de asemenea foarte des şi 2-mercaptoetanol. Mobilitatea electroforetică a majorităţii proteinelor (dar nu şi a glicoproteinelor), depinde de dimensiunea lor, deoarece sarcina negativă adusă de moleculele de SDS legate de proteină este mult mai mare decât sarcina netă a proteinei însăşi. O distribuţie specifică («pattern») de benzi se obţine la colorarea gelului cu Albastru Coomassie.

Gelul de agaroză poate fi folosit în locul celui de poliacrilamidă în cazul proteinelor mai mari sau pentru a obţine o separare diferită în absenţa SDS.

Se poate aplica şi metoda PAGE bidimensională, folosind condiţii de lucru diferite pe cele două direcţii de migrare: de exemplu, un gradient constant de pH (pH 4-7) pe o direcţie şi un gradient de 11-14% poliacrilamidă în cealaltă direcţie.

LEGĂTURI NECOVALENTE ÎN PROTEINE

Distribuţia aminoacizilor încărcaţi dintr-un lanţ polipeptidic a fost prezentată anterior. Grupările purtătoare de sarcini joacă un rol important în împachetarea lanţului macromolecular deoarece grupările având aceleaşi sarcini se vor respinge reciproc, în timp ce grupările încărcate pozitiv se vor atrage cu cele încărcate negativ dacă sunt apropiate unele de altele. Există totuşi şi alte numeroase interacţiuni importante între catenele laterale R ale proteinelor. Acestea sunt ilustrate în fig. 2.15.

Interacţiunile ionice la care s-a făcut deja referire sunt cunoscute de asemenea ca punţi saline şi sunt ilustrate prin interacţiunea între glutamat şi arginină. Legăturile S-S formate prin oxidarea a două grupări sulfhidril sunt covalente. Acestea, în special, se pare că apar în proteine cu scopul de a le mări rigiditatea atunci când mediul fiziologic este neprietenos. Un astfel de exemplu sunt proteinele din secreţiile digestive ale pancreasului.

Celelalte interacţiuni sunt descrise ca necovalente şi ele pot fi atât nepolare (de exemplu hidrofobe) cât şi polare (de exemplu, legăturile ionice şi cele de hidrogen). Interacţiunile hidrofobe rezultă din: (1) interacţiunile van der Waal's ce rezultă în urma atracţiei dintre atomi datorită dipolilor electrici fluctuanţi ce apar între nucleul pozitiv al moleculei şi învelişul electronic negativ; (2) efectul hidrofob, datorat tendinţei grupărilor nepolare de a se asocia între ele, mai degrabă decât de a fi în contact cu apa. Legăturile de hidrogen apar deoarece atunci când un atom de hidrogen este legat de unul de oxigen, se produce o deplasare de electroni care lasă o sarcină parţial negativă la celălalt atom. Acest lucru generează un dipol electric care poate interacţiona cu dipolii existenţi deja în alte regiuni ale moleculei. Cea mai obişnuită legătură de hidrogen este cea dintre grupări le –N-H şi –C=O, ce apare în structura de α-helix şi în cea de foaie pliată β (ce urmează a fi descrisă în Capitolul 4), dar şi alte legături sunt posibile, precum se vede în fig. 2.15.

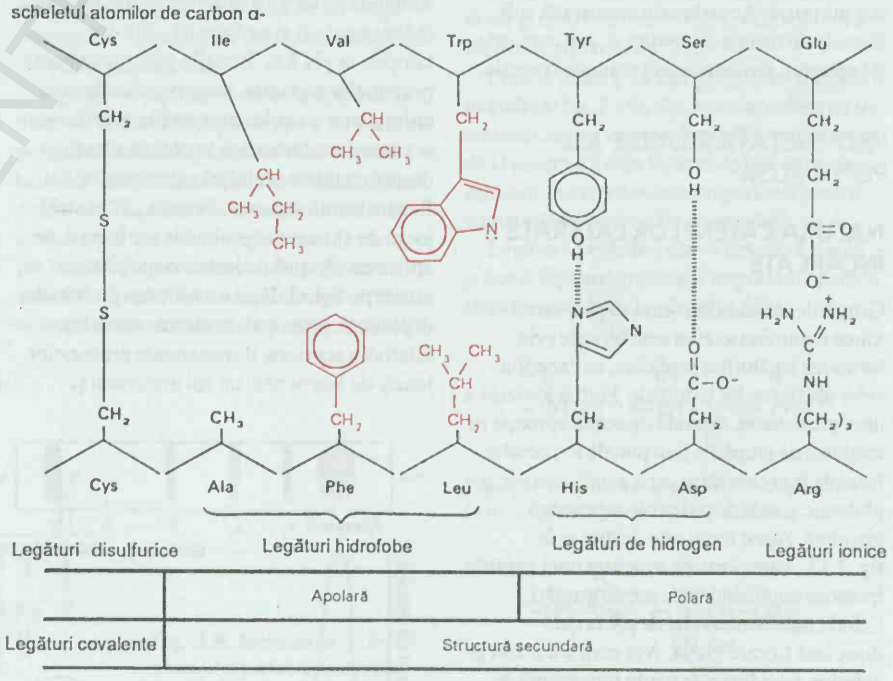


Fig. 2.15. Contribuţia legăturilor necovalente la formarea structurii terţiare a proteinelor. Sunt ilustrate diferitele tipuri de legături ce pot apărea.

PURIFICAREA PROTEINELOR ŞI DETERMINAREA MASEI MOLECULARE RELATIVE

PURITATE ŞI OMOGENITATE

Purificarea moleculelor mici se consideră încheiată în mod tradiţional cu etapa de cristalizare şi de determinare a unor parametri fizici ca de exemplu punctul de topire, dar aceste proceduri sunt mult mai puţin aplicabile în cazul macromoleculelor de tipul proteinelor. Chiar dacă sunt cristalizate, ele ar putea fi contaminate cu alte proteine, virusuri sau alţi agenţi infecţioşi, cum sunt prionii (vezi p. 16). Obiectivul principal în purificarea proteinelor este de aceea obţinerea unui produs omogen conform tuturor criteriilor cunoscute, care includ în mod obişnuit electroforeza în diferite condiţii. Pentru realizarea acestui scop, se aplică numeroase metode, bazate pe proprietăţile caracteristice ale proteinelor, în special pe abilitatea lor de a reacţiona specific cu moleculele mici. Metodele folosite nu trebuie să modifice structura nativă a proteinei şi nici să-i afecteze activitatea biologică. Metode tradiţionale utilizau solubilitatea diferenţiată a proteinelor în soluţii de sulfat de amoniu, dar un număr mult mai mare de metode sunt acum disponibile, printre ele cromatografia prin gel-filtrare, cromatografia de schimb ionic (similară celei descrise deja pentru aminoacizi, dar care foloseşte celuloză sau Sephadex) şi cromatografia de afinitate (vezi p. 70). Câteva din aceste metode sunt descrise în continuare.

BIBLIOTECA CENTRALĂ UMF "IULIU HAŢIEGANU" CLUJ-NAPOCA LIBRARY

CROMATOGRAFIA PRIN GEL-FILTRARE

Această tehnică utilizează o matrice pe bază de dextran, care este reticulat («cross-linked») încât să formeze o rețea ce poate fi penetrată numai de molecule având o anumită dimensiune (cu cât legăturile încrucișate sunt mai dese, cu atât ochiurile rețelei sunt mai mici). Numele comercial al dextranului este Sephadex; se produc tipuri diferite de Sephadex ele deosebindu-se prin dimensiunile diferite ale ochiurilor rețelei sale în funcție de gradul de reticulare. Principiul metodei este arătat în fig. 2.16. Moleculele mari, care penetrează mai puțin rețeaua, au la dispoziție un volum de deplasare mult mai redus și de aceea vor fi eluate mult mai rapid. Coloana se umple în mod obișnuit cu matricea care urmează a fi folosită. Metoda se poate utiliza pentru a separa molecule mici (de exemplu sărurile), de molecule mai mari (cum ar fi proteinele) și pentru a separa între ele macromolecule de dimensiuni diferite. Alte materiale cum sunt agaroza sau Sepharoza (un tip de agaroză) se pot folosi ca bază pentru matrice.

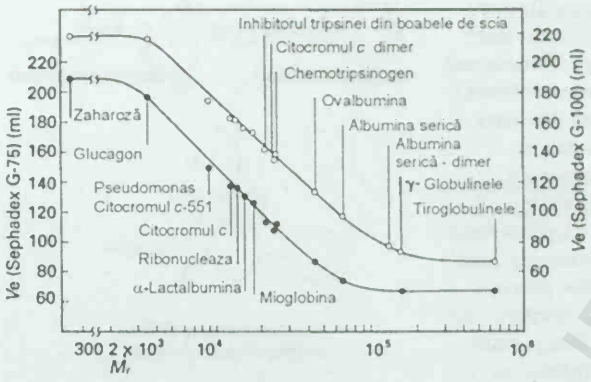


Fig. 2.17. Cromatografia prin gel-filtrare folosită pentru a determina M_r a unei proteine.

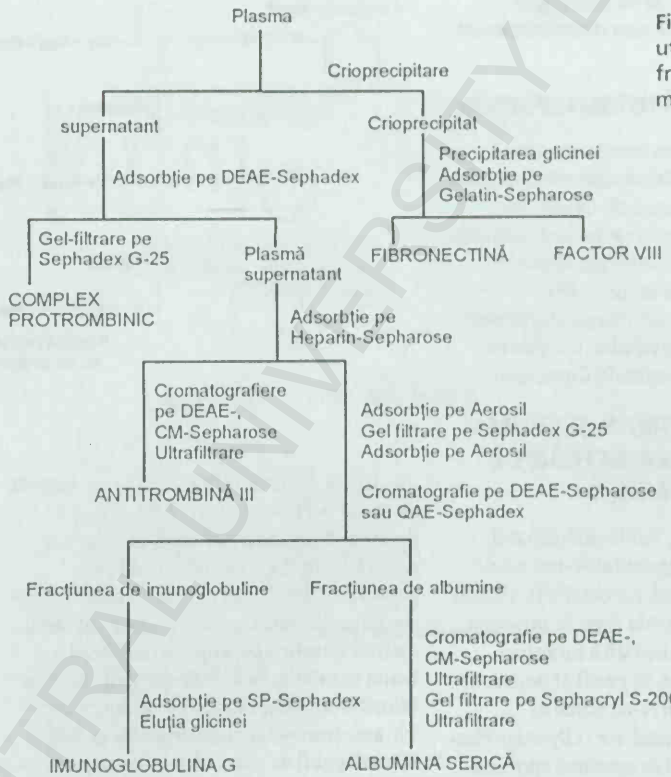


Fig. 2.18. Metode utilizabile pentru fracționarea pe scară mare a proteinelor.

NOMENCLATURA FOLOSITĂ PENTRU DIMENSIUNEA ȘI DENSITATEA MACROMOLECULELOR

Anterior, dimensiunea unei molecule era exprimată cu ajutorul masei sale moleculare, dar astăzi se preferă termenul de masă moleculară relativă (prescurtată M_r). Atât M_r cât și masele moleculare sunt rapoarte și de aceea este incorect să le atașăm unități de măsură cum sunt daltonii (simbolizați Da). Este incorect a spune că „M_r sau greutatea moleculară a substanței X este 10^5 Da"; exprimarea corectă este: „M_r=10 000". Daltonul este o unitate de masă egală cu a 12-a parte a masei atomului de carbon. Prin urmare, este corect a spune că „masa moleculară a lui X este 10^5 Da" sau se pot folosi expresii de felul "peptida de 16 000 Da". Pentru entități ce nu au o M_r definibilă [precisă], este corect a spune, de exemplu, că „masa unui ribozom este 10^7 Da". Un kilodalton (simbolizat kDa) este egal cu 1000 Da.

Gel-filtrarea poate fi folosită pentru determinarea M_r a unei proteine. În fig. 2.17 sunt prezentate graficele volumelor de eluție (V_e) pe Sephadex G-75 și G-100 ale unor proteine native având M_r cunoscute, în funcție de log M_r.

SEPARAREA PROTEINELOR PE SCARĂ MARE

Schema din fig. 2.18 prezintă câteva din numeroasele metode folosite pentru separarea proteinelor plasmatice. Crioprecipitarea depinde de solubilitatea redusă a unor proteine la rece. DEAE (dietilaminoetil)-, QAE (sarea cuaternară de aminoetil)- și SP (sulfopropil)-Sephadex (sau Sepharose) asigură separarea prin schimb ionic, la fel ca și CM (carboximetil)-Sepharose. În mod regretabil unii componenți ai serului, cum este Factorul VIII, folosit în tratamentul hemofiliei, a fost contaminat la un moment dat cu virusul imunodeficienței umane (HIV, vezi p.28), trebuie să ne reamintească dificul-tățile întâlnite în purificarea proteinelor. Tratamentul termic este folosit astăzi pentru a inactiva HIV, care reprezintă cauza îmbolnăvirilor cu virusul SIDA.

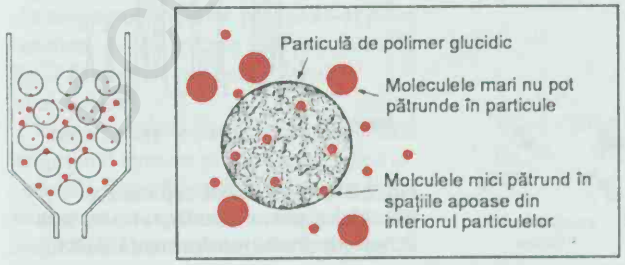


Fig. 2.16. Cromatografia prin gel-filtrare folosită pentru îndepărtarea moleculelor mici din soluțiile proteinelor și pentru separarea proteinelor dintr-un amestec pe baza dimensiunilor lor.

METODE FOLOSITE PENTRU DETERMINAREA SECVENȚEI AMINOACIZILOR DIN PROTEINE

STRATEGIA GENERALĂ

Proteinele posedă secvențe precis definite ale aminoacizilor. Există numeroase motive care fac utilă aflarea acestor secvențe pentru

fiecare proteină. Aşa cum se va arăta mai târziu (p.33), s-ar putea realiza acest lucru printr-o metodă indirectă, după determinarea structurii genei corespunză-toare proteinei şi stabilirea secvenţei aminoacizilor pe baza informaţiilor deduse din codul genetic. Metodele directe implică determinarea aminoacidului N-terminal, urmată de degradarea Edman. Deoarece această metodă este limitată la numai 50 de aminoacizi, este necesară mai întâi ruperea proteinelor mai mari în polipeptide mai scurte fie chimic, fie folosind enzime proteolitice. Este posibilă deducerea secvenţei întregii proteine, cu condiţia ca peptidele să se suprapună parţial. Aceste metode sunt descrise succint în continuare.

REACŢII LA CAPĂTUL N-TERMINAL

Metoda iniţială folosea reacţia aminoacidului N-terminal cu fluorodinitrobenzen, dar astăzi se folosesc clorura de dabsil sau clorura de dansil. După reacţia cu clorura de dabsil, peptida este hidrolizată în mediu acid, aşa cum se arată în fig. 2.19 şi aminoacidul N-terminal intens colorat este identificat prin cromatografie. Clorura de dansil formează sulfonamide fluorescente.

DEGRADAREA EDMAN ŞI CROMATOGRAFIA ÎN FAZĂ LICHIDĂ DE ÎNALTĂ PERFORMANŢĂ

În degradarea Edman, fenilizotiocianatul reacţionează cu aminoacidul N-terminal. Fragmentul N-terminal marcat (PTH-alanina din prima etapă) se poate rupe în prezenţa unui acid de tărie medie fără a hidroliza restul peptidei. Astfel, în pasul al doilea, se poate determina restul N-terminal al peptidei mai scurte rezultate (Gly-Asp-Phe-Arg-Gly) şi procedeul se continuă apoi analog pas cu pas (fig. 2.20). După alte patru reluări ale degradării Edman se dezvăluie secvenţa completă a peptidei de plecare.

Într-un secvenţializator, un instrument automatizat de determinare a secvenţei aminoacizilor, PTH-aminoacidul eliberat este identificat prin cromatografie în fază lichidă de înaltă performanţă (HPLC). Fig. 2.21 ilustrează capacitatea HPLC de a separa peptidele, în acest caz un amestec de peptide răspândite în natură. Tehnica se bazează pe folosirea unor coloane conţinând matrici ultrafine capabile să dea rapid o înaltă rezoluţie. În cazul prezentat aici, s-a folosit o coloană cu schimb cationic, dar filtrarea prin gel şi cromatografia în fază inversă pot fi de asemenea utilizate.

DESFACEREA CHIMICĂ SAU ENZIMATICĂ A LEGĂTURILOR PEPTIDICE

Pentru a cliva în mod specific lanţul polipeptidic lângă un anume aminoacid, se foloseşte de obicei un singur reactiv; acesta este bromura de cian (CNBr), care permite ruperea lanţului în imediata apropiere a restului de metionină aşa cum se arată şi în fig. 2.22. Specificitatea diferitelor enzime proteolitice poate fi utilizată pentru degradarea proteinelor în peptide. Tripsina hidrolizează polipeptidele la partea carboxilică a resturilor de arginină şi lizină. Acţiunea unor enzime proteolitice diferite este prezentată la p. 143.

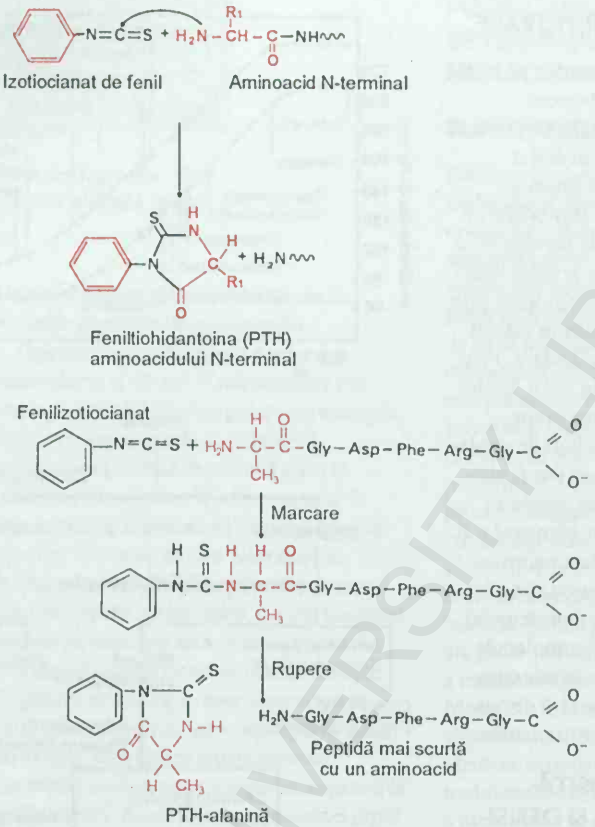


Fig. 2.20. Degradarea Edman a unei peptide.

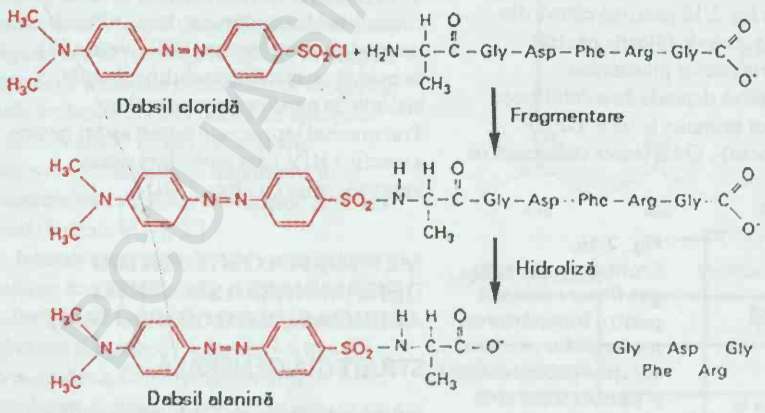


Fig. 2.19. Determinarea restului N-terminal al unei peptide utilizând clorura de dabsil.

ORGANIZAREA STRUCTURALĂ A PROTEINELOR

Lanţurile polipeptidice ale proteinelor se pliază în diferite moduri, atât în cadrul propriului lanţ, dar şi între lanţurile vecine, adică intracatenar şi intercatenar. Acest mod de pliere este esenţial pentru activitatea biologică a proteinelor şi această organizare

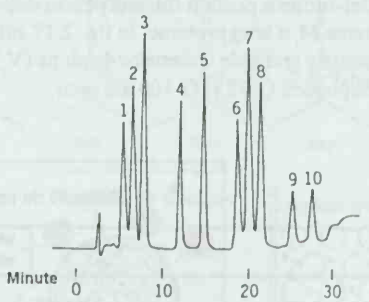


Fig. 2.21. Exemplu de separare a peptidelor prin cromatografie în fază lichidă de înaltă performanţă (HPLC).

BCU IAŞI - UNIVERSITY LIBRARY

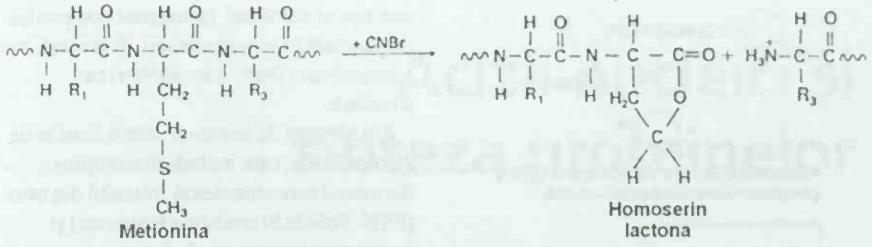


Fig. 2.22. Exemplu de scindare chimică a legăturii peptidice.

complicată este cea care trebuie conservată pe parcursul procedurilor implicate în purificarea proteinelor. Deși mult timp s-a considerat că modurile de pliere ale lanțurilor polipeptidice sunt determinate numai de secvența aminoacizilor din lanț, astăzi s-a stabilit că proteinele având aceeași secvență a aminoacizilor pot exista în forme diferite de împachetare și că astfel de plieri pot fi influențate de prezența altor proteine, cunoscute sub numele de molecule „supraveghetoare" tip „scufiță" („chaperones") (vezi p. 16).

Este util a analiza structura proteinelor având în vedere patru niveluri ierarhice de organizare, prezentate în fig. 2.23.

DENATURAREA ȘI RENATURAREA PROTEINELOR

O proteină care posedă o proprietate biologică proprie, unică, se numește proteină nativă și ea se deosebește de proteina ce și-a pierdut această proprietate și pe care o numim de aceea denaturată. O proteină denaturată și-a pierdut structura tridimensională sau, în alți termeni, conformația sa. Denaturarea poate fi reversibilă sau ireversibilă. Un exemplu de denaturare ireversibilă este cea termică, aplicată la fierberea unui ou; albușul oului (albumina) se coagulează astfel ireversibil. De fapt acesta este un eveniment obișnuit în timpul gătitului, care face proteinele mult mai ușor atacabile de către enzimele proteolitice după ingestia mâncărurilor.

Denaturarea reversibilă se poate realiza prin folosirea atentă a unor reactivi ca ureea și mercaptoetanolul. Ureea distruge structura apei și de aceea limitează interacțiunile hidrofobe ale catenelor laterale R din resturile de aminoacizi (vezi p. 8), ceea ce duce la deplierea și la disocierea moleculelor proteice. Mercaptoetanolul reduce legăturile S-S. De aceea, la îndepărtarea ureei și a mercaptoetanolului, proteina s-ar putea renatura. Aceste procese sunt prezentate în fig. 2.24 pentru cazul particular al ribonucleazei.

Renaturarea este interpretată ca o dovadă în sprijinul ipotezei că o proteină având o structură primară „corectă" se va plia în mod spontan, conducând la structura unică responsabilă pentru activitatea sa biologică.

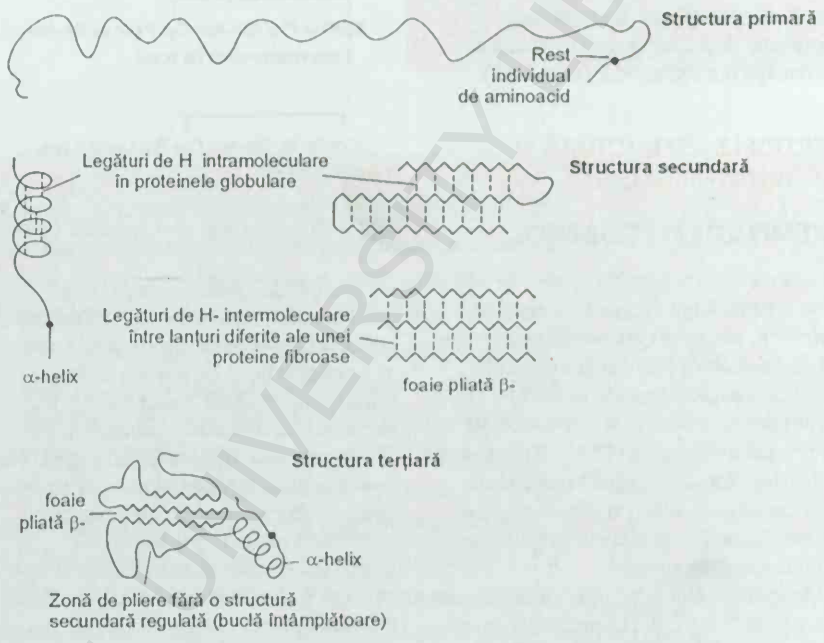


Fig. 2.23. Structura proteinelor, imaginată ca având patru niveluri ierarhice de organizare.

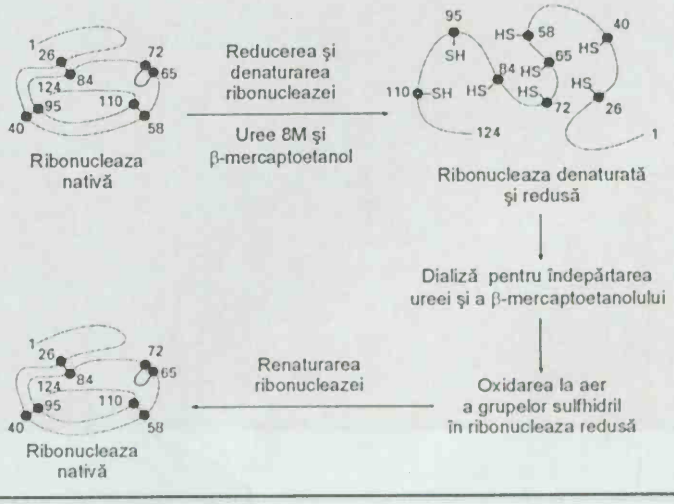


Fig. 2.24. Denaturarea proteinelor ilustrată de tratamentul asupra ribonucleazei.

Acest fenomen este denumit auto-asamblare a proteinei. Astăzi se ştie că renaturarea proteinelor poate fi asistată pe două căi. Una implică protein disulfid izomeraza, o enzimă care are rolul de a „corecta" legăturile S-S greşit formate. A doua cale implică structurile tip „chaperone" moleculare, la care s-a mai făcut deja referire. Ele se pot defini ca o familie de proteine din clase neînrudite care mediază asamblarea corectă a altor polipeptide, dar care nu sunt componente ale structurilor funcţionale asamblate. Exemple sunt proteinele de şoc termic şi particulele de recunoaştere a semnalelor (vezi p. 42).

PEPTIDELE – STRUCTURĂ ŞI ACTIVITATE BIOLOGICĂ

EXEMPLE DE PEPTIDE MICI

Există numeroase peptide ce apar în natură şi au o gamă largă de funcţii, cum ar fi hormonii, mesagerii primari în neurotransmisie, mediatorii locali şi antibioticele. Lungimea acestor peptide variază de la trei resturi de aminoacizi cum este hormonul ce eliberează tireotropina (TRH – Tireotropin Releasing Hormone), până la cei 231 de aminoacizi constituenţi ai gonadotropinei umane. Chiar şi cele mai mici peptide au o acţiune foarte specifică.

Structurile câtorva peptide specifice sunt prezentate în fig. 2.25. Capetele N- sau C-terminale sunt deseori modificate. De aceea, în cazul TRH, capătul N-terminal este un acid glutamic ciclizat (acid piroglutamic), în timp ce la capătul C-terminal este o amidă. Este posibil ca astfel de modificări să mărească stabilitatea metabolică prin protejarea peptidelor împotriva exopeptidazelor.

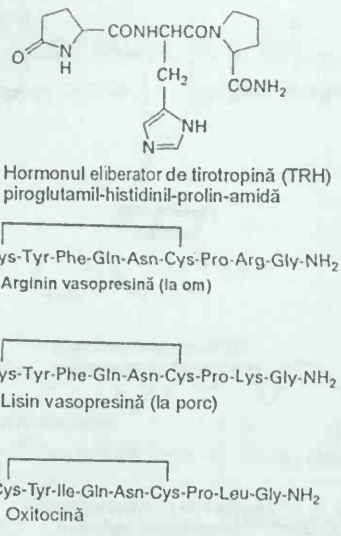


Fig. 2.25. Structura unor peptide tipice.

Exemple de hormoni peptidici scurţi produşi de lobul posterior al hipofizei sunt oxitocina şi vasopresina. Structurile lor sunt prezentate în fig. 2.25; din nou capătul C-terminal este o amidă. Vasopresinele sunt denumite mai corect hormoni antidiuretici (ADH) deoarece acţiunea lor fiziologică cea mai importantă este de a stimula reabsorbţia apei din tuburile renale distale. Oxitocina accelerează naşterea, prin stimularea contracţiilor muşchilor netezi uterini. Aceste structuri ilustrează specificitatea peptidelor prin faptul că mici schimbări ale structurii sunt asociate cu modificări funcţionale majore.

Numeroase dintre peptidele antibiotice sunt ciclizate.

EXEMPLE DE HORMONI PROTEICI

Somatotropina (hormonul de creştere) şi prolactina sunt hormoni proteici ai lobului anterior al hipofizei; lactogenul este produs de placentă în timpul sarcinii. Toţi aceşti trei hormoni sunt foarte asemănători ca structură.

Un alt grup de hormoni sunt o familie de glicoproteine, care include tireotropina, hormonul care stimulează foliculul din ovar (FSH- Folicle Stimulating Hormone) şi gonadotropina corionică. Toţi aceşti compuşi au legate la atomul de azot din asparagină numeroase lanţuri glucidice ramificate – de aici provenind şi denumirea grupului.

Unii hormoni peptidici sunt iniţial sintetizaţi ca peptide mai lungi, care sunt ulterior degradate în ţesuturi în peptide mai scurte având fiecare roluri diferite. Astfel de precursori peptidici lungi sunt denumiţi poliproteine. Exemple potrivite în acest sens sunt peptidele hormonului adreno-corticotrofic (ACTH – Adreno Cortico Tropine Hormone) produse din proopiocorticotropină (vezi p. 32).

PRIONII

Denumirea de prioni provine de la „particula proteică infecţioasă", considerată a fi agentul infecţios în encefalopatiile transmisibile, ca de exemplu boala Creutzfeldt-Jakob, encefalopatia „scrapie" si encefalopatia spongiformă a bovinelor. O formă neinfecţioasă a prionului având o funcţie necunoscută, este prezentă în numeroase celule ale corpului. Această proteină are o structură cu numeroase regiuni de tip α-helix şi este susceptibilă a fi degradată de proteinaza K. Prionul normal poate fi convertit în condiţii *in vitro*, fără modificări de legături covalente, la o formă ce conţine numeroase porţiuni pliate de tip β şi care este rezistentă faţă de proteinaza K.

BCU IAŞI/CENTRU UNIVERSITAR

Acizii nucleici și sinteza proteinelor

3

În acest capitol sunt descrise mecanismele care sunt implicate în sinteza și organizarea acizilor nucleici și ale proteinelor, împreună cu factorii importanți care controlează aceste procese.

Acizii nucleici sunt sintetizați din nucleotide sub formă de lanțuri liniare care apoi sunt compactate în cromatină, replicate prin ciclul celular și în final degradate. Mutageneza și mecanismele de reparare pot altera structura ADN. Transcrierea ADN pentru a produce ARN în celule normale și virusuri este descrisă împreună cu transcrierea inversă („revers-transcription"), ce are loc în retrovirusuri, și cu efectele antibioticelor și ale antimetaboliților.

Sunt descrise diferitele stadii ale sintezei proteice incluzând rolul ribozomilor, al ARN mesager și de transport și codul genetic. Prezența intronilor, a exonilor și a genelor discontinue („split genes") permit generarea unei diversități de anticorpi și de mecanisme de control. Operonul *lac* și modularea hormonală sunt prezentate ca exemple ale proceselor de control.

Lanțurile de proteine nou sintetizate sunt transportate și suferă modificări finale în aparatul Golgi. „Reciclarea" proteinelor implică lizozomii și ubiquitina.

Capitolul se încheie cu o discuție a tehnicilor și aplicațiile ingineriei genetice și ale analizei moleculare.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

INTRODUCERE: REPLICAREA, TRANSCRIEREA ŞI TRADUCEREA

Înainte de a trece la aspecte de detaliu privind biosinteza acizilor nucleici şi a proteinelor, trebuie clarificate caracteristicile schemei prezentate în fig. 3.1. Replicarea se referă atât la biosinteza ADN, cât şi a ARN, unde acidul nucleic parental serveşte ca matriţă („template") ce determină structura produsului sintetizat. Transcrierea înseamnă schimbarea tipului (naturii) acidului nucleic, de la ADN la ARN, iar transcrierea opus este procesul invers. Când ADN este transcris în ARN se pot identifica trei tipuri de ARN: ARN mesager (ARNm), ARN de transfer (ARNt) şi ARN ribozomal (ARNr). Liniile punctate indică procese care au loc în virusuri şi indică faptul că genomul unui virus poate conţine ADN sau ARN. ARN viral se poate replica fie direct, fie după o preliminară transcriere inversă la ADN. Traducerea înseamnă conversia ARN în polipeptide, în acest caz ARNm fiind utilizat ca matriţă care direcţionează şi determină structura primară a polipeptidului. Polipeptidul este adesea modificat prin hidroxilarea, fosforilarea sau glicozilarea catenelor R ale resturilor unor aminoacizi selectaţi. Acest proces este cunoscut sub numele de modificare post-traducere.

Aşa-numita dogmă centrală a lui Crick a constat în faptul că informaţia conţinută în structura polipeptidului vine unilateral prin transmiterea informaţiei de la acidul nucleic la polipeptid şi nu poate fi transmisă invers, de la polipeptid la acid nucleic sau de la un polipeptid la un alt polipeptid. Deşi au apărut alte descoperiri de la prima prezentare a acestei dogme în 1958, aceasta rămâne valabilă şi utilizată ca referinţă.

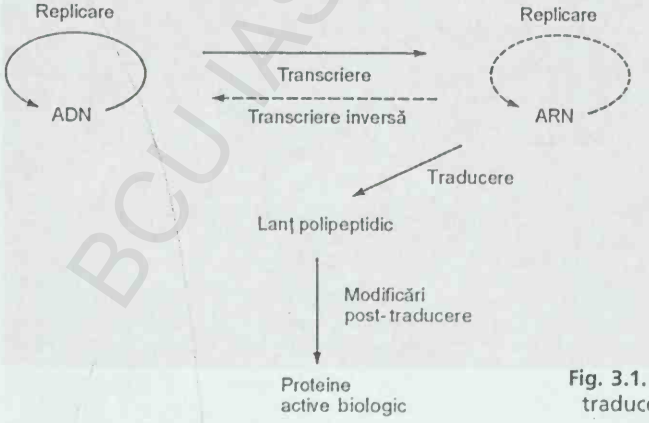


Fig. 3.1. Replicare, transcriere, traducere – dogma centrală.

STRUCTURA ACIZILOR NUCLEICI ŞI SINTEZA LOR

ASPECTE GENERALE ALE STRUCTURII

Acizii nucleici sunt polimeri

Există două tipuri de acizi nucleici: acidul dezoxiribonucleic (ADN) şi acidul ribonucleic (ARN). Acizii nucleici sunt produşi de policondensare, unitatea monomeră fiind un nucleotid, astfel că toţi acizii nucleici sunt polinucleotide. Un nucleotid are trei componente:

fosfat- 5'-glucid-1'-N-bază

În ADN glucidul este o dezoxiriboză iar în ARN glucidul este riboza. Gruparea 2'-hidroxil prezentă în ARN îl face susceptibil la hidroliză alcalină, în timp ce ADN este rezistent . În schimb, atât ADN cât şi ARN sunt hidrolizaţi în mediu acid. Nucleotidele sunt legate în polinucleotide prin formare de legături fosfodiesterice. Structura de bază a unui polinucleotid este, prin urmare, prezentată în fig.3.2.

Lanţul polinucleotidic are o anumită polaritate, care nu este aceeaşi pe direcţii diferite. Prin convenţie, ordinea nucleotidelor conţinând diferite baze este citită de la capătul 5' spre capătul 3'. Lanţul cu polaritate opusă se numeşte antiparalel.

Fig. 3.3. prezintă o parte a unui lanţ de ARN. În ADN gruparea 2'-OH este înlocuită de H. Atomii de carbon din bazele azotate sunt numerotaţi 1, 2, 3 etc. şi cei din dezoxiriboză şi riboză numerotaţi 1', 2', 3' etc.

Componente

În mod caracteristic sunt doar patru baze azotate diferite în ADN sau ARN. Singura diferenţă între ele este că ADN conţine timină (T) în timp ce ARN conţine uracil (U). Numele şi structurile bazelor sunt prezentate în fig. 3.4. În ARNt, este prezentă şi inozina (I). Inozina este nucleozidul hipoxantinei, adenina care este deaminată. ARNt conţine, de asemenea, alte nucleozide neuzuale cum sunt pseudouridina, ribotimidina şi dihidrouridina.

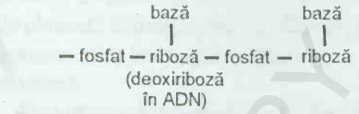


Fig. 3.2. Structura unui polinucleotid cu cele trei componente: fosfat, riboză şi o bază azotată.

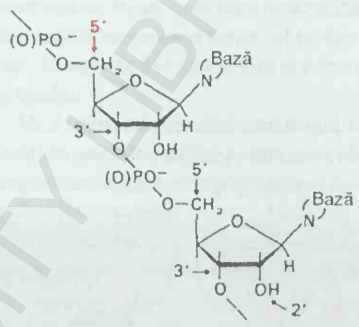


Fig. 3.3. Legarea nucleotidelor în ARN. În ADN gruparea 2'-OH este înlocuită de H.

În timp ce, aşa cum s-a văzut mai sus, un nucleotid are trei componente, un nucleozid are două componente (glucid-1'-N-bază). Ca urmare, un nucleotid cu trei grupări fosfat ataşate la un nucleozid la poziţia 5' a glucidului se numeşte nucleozid trifosfat; astfel ATP se numeşte adenozin trifosfat (P-P-P-5'-riboză-1-adenină).

Numele de adenozin difosfat (ADP) şi adenozin monofosfat (AMP) şi termeni similari ce corespund altor baze azotate se obţin în mod analog. Aceştia sunt prezentaţi în tabelul 3.1.

Acizii nucleici sunt caracterizaţi prin ordinea celor patru nucleotide diferite se găsesc în lanţul polinucleotidic. Aşa cum s-a menţionat înainte, secvenţa de baze azotate este dată în direcţia 5'- 3'; prin urmare, pApCpGpApT specifică faptul că secvenţa în polinucleotid începe cu A la capătul 5' şi are T la capătul 3'. Litera „p" indică prezenţa unei grupări fosfat iar litera mare, tipul bazei azotate din nucleotid.

CONFORMAŢIA HELIXULUI DUBLU CATENAR AL ADN

ADN există ca un helix dublu cu două lanţuri (catene) care au direcţii opuse (antiparalele), dar pot să difere prin conformaţie – fenomen numit polimorfism structural. La ADN se cunosc două conformaţii dublu helicoidale orientate spre dreapta: ADN -A şi ADN-B (lanţurile se răsucesc spre

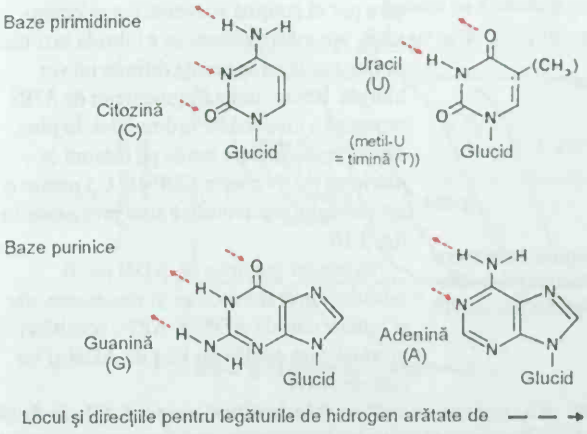
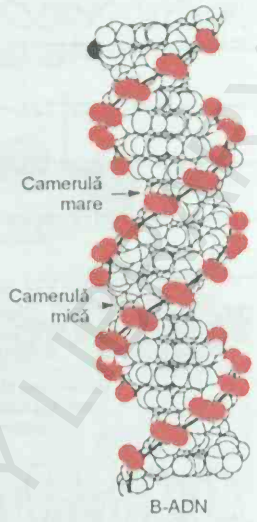
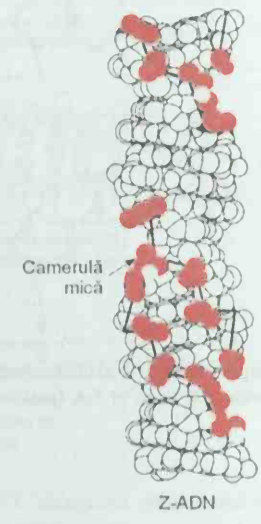


Fig. 3.4. Structura pirimidinei și a bazelor purinice. Este indicat prin săgeți locul de legare a glucidului (riboza în ARN și dezoxiriboza în ADN).





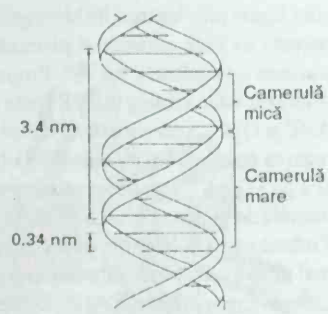


Fig. 3.5. Conformația dublului helix ADN. Când umiditatea relativă este redusă, ADN-B suferă o modificare conformațională la ADN-A.

Tabelul 3.1. Nomenclatura bazelor azotate și a nucleotidelor și nucleozidelor rezultate

Baze azotate	Nucleozide*	Nucleotide**
Purine		
Adenina	Adenozina (A)	Acid adenilic (AMP)
Guanina	Guanozina(G)	Acid guanilic (GMP)
Hipoxantina	Inozina (I)	Acid inozinic (IMP)
Pirimidine		
Citozina	Citidina (C)	Acid citidilic (CMP)
Uracil (în ARN)	Uridina (U)	Acid uridilic (UMP)
Timina (5-metiluracil) în ADN	Timidina (T)	Acid timidilic (TMP)

* În polimeri cu unități repetitive, literele indică nucleotide, de exemplu poli(A) și poli(dT)
** Când glucidul este dezoxiriboză, nucleozidul și nucleotidul este prescurtat dT, dAMP, etc. dNTP semnifică un deoxinucleozid trifosfat nespecificat.

Tabelul 3.2. Mărimea moleculelor de ADN din diferite surse

Sursa	Număr de baze azotate	Lungime (mm)
Virusuri		
Polioma SV40	$5{,}1 \times 10^3$	1,7
Bacteriofagul T2	$1{,}66 \times 10^5$	55
Bacterii		
Escherichia coli	$4{,}7 \times 10^6$	1360
Om	$2{,}9 \times 10^9$	990 000

dreapta pe măsură ce progresează în sus). ADN-B este caracterizat printr-o repetiție regulată a șanțurilor de tip minor și major așa cum este reprezentat în fig. 3.5. Grupările fosfat sunt prezentate în roșu. O formă diferită de ADN este ADN-Z care are un helix orientat spre stânga. Neregularitatea scheletului ADN-Z este ilustrată prin linia groasă care leagă grupările fosfat. Se speculează că este posibilă schimbarea conformației ADN *in vivo* și că aceasta poate fi importantă în exprimarea genică. Astfel, transcrierea ADN (vezi. pag. 27) are loc, probabil, la joncțiunea dintre ADN-B și ADN-Z unde are loc desfacerea helixului.

DENATURAREA ȘI HIBRIDAREA

Mărimea ADN

Mărimea ADN în celulă diferă mult în funcție de sursă, așa cum este arătat în tabelul 3.2. ARN este de obicei mult mai mic decât ADN.

Denaturare și renaturare

În contrast cu ADN, ARN este de obicei monocatenar, dar este caracterizat de prezența unor legături de hidrogen intracatenare. Un exemplu tipic este structura în formă de frunză de trifoi a ARNt, care este explicată în pag. 34.

IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

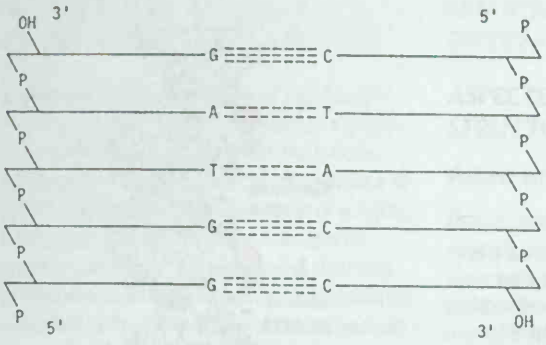


Fig. 3.6. Legături de hidrogen între lanțurile antiparalele ale moleculei de ADN.

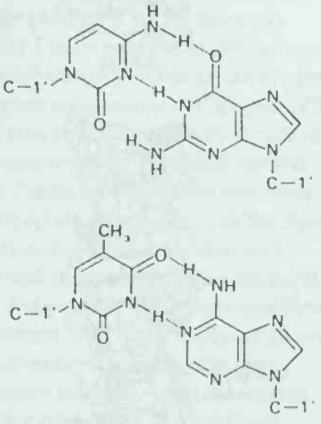


Fig. 3.7. Imperecherea bazelor azotate. Împerecherea G:C (sus) și T:A (jos).

Cele două lanțuri ale ADN dublu catenar sunt legate prin legături de hidrogen între perechi de baze purinice și pirimidinice, așa cum este arătat în fig. 3.6. Proporția între diferitele baze azotate în ADN este astfel: A=T și G=C. Aceasta este în acord cu legarea prin legături de hidrogen a lui A cu T și a lui G cu C. Acest fapt este cunoscut sub numele de împerechere a bazelor (fig. 3.7.). Trebuie notat că legătura dintre G și C este mai puternică decât legătura dintre A și T. Catenele antiparalele în ADN legate prin perechi de baze (bp) se numesc complementare.

În timp ce denaturarea unei proteine implică pierderea structurii terțiare, denaturarea ADN dublu catenar implică separarea celor două catene complementare. Denaturarea este de obicei efectuată experimental prin încălzire, temperatura la care 50% dintre catene sunt separate se numește temperatură de topire (Tm). Fenomenul invers, când cele două catene se reasociază, se numește renaturare. Aceste fenomene sunt prezentate în fig. 3.8. În locul încălzirii, denaturarea ADN se poate face prin creșterea pH-ului la aproximativ 12 (0,5 M NaOH).

Curba C_0t

Progresia denaturării poate fi urmărită prin măsurarea absorbției soluției la lungimea de undă corespunzătoare maximului de absorbție a bazelor azotate (aproximativ 260 nm) sau prin măsurarea sensibilității probelor față de nucleaze care sunt specifice pentru lanțurile monocatenare (vezi p. 25).

Fenomenele de mai sus sunt ilustrate în fig. 3.9., care arată durata unei reacții ideale, de ordinul doi și caracteristicile unei reprezentări semilogaritmice în funcție de log C_0t. Ecuația reprezintă fracțiunea de ADN care rămâne monocatenară la orice moment de la inițierea reacției. Pentru acest exemplu, K este considerat 1 iar fracțiunea rămasă monocatenară este reprezentată în funcție de produsul dintre concentrația totală (C_0) și timp (t) pe scară logaritmică.

ADN dublu catenar de la diferite specii poate fi scindat în porțiuni de lungime moderată și denaturate. Dacă fragmentele denaturate sunt amestecate și renaturate, cele care au secvențe de nucleotide similare (și care pot să conțină secvențe complementare), vor avea tendința de a hibrida în timp ce porțiunile cu secvențe diferite nu vor hibrida. Reasocierea fragmentelor de ADN urmează o cinetică de ordinul doi. În plus, viteza de reasociere scade pe măsură ce mărimea ADN crește. Curbele C_0t pentru o porțiune polinucleotidică sunt prezentate în fig. 3.10.

Nu numai lanțurile de ADN pot fi hibridate prin denaturare și renaturare, dar și amestecuri de ADN și ARN, rezultând produși care conțin un lanț de ADN și un lanț de ARN.

Metodele de hibridare pot fi folosite în diferite feluri. Utilizarea sondelor în metodele Southern blotting și hibridare *in situ*, prin care sunt detectate în celule lanțuri complementare de ADN sau ARN, vor fi prezentate ulterior (p. 47).

STRUCTURA CROMATINEI

Principii generale

Cromatina este complexul ADN-proteine al unei mase dezorganizate („entangled") de fibre în care, când celulele ce nu se divid, sunt segregați cromozomii. Molecula de ADN a unui cromozom de la organisme superioare s-ar întinde pe o distanță de centimetri dacă ar fi desfășurată, dar ea trebuie să fie foarte împachetată (printr-un proces numit compactare) în nucleu. Molecula de ADN trebuie, de asemenea, să se organizeze în unități funcționale care să permită exprimarea genelor și replicarea lor. O imagine schematică a diferitelor niveluri de organizare a structurii unui cromozom este prezentată în fig. 3.11.

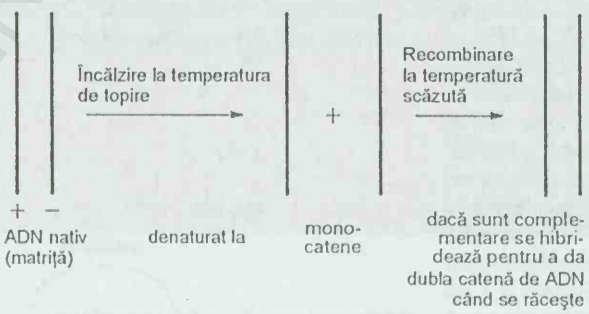


Fig. 3.8. Denaturarea și renaturarea ADN.

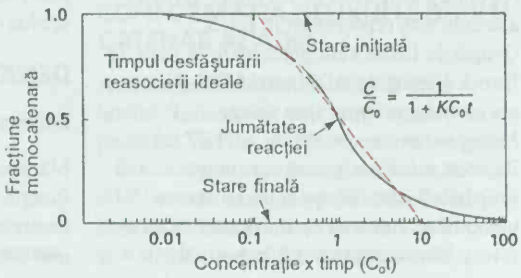
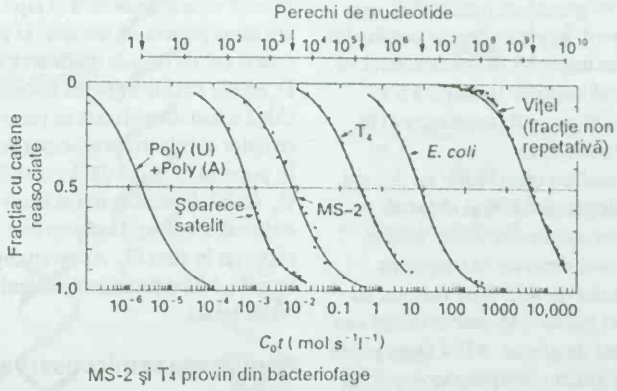


Fig. 3.9. Curba C_0t.



MS-2 și T4 provin din bacteriofage

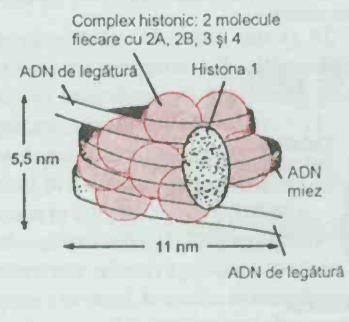
Fig. 3.10. Reasocierea acizilor nucleici dublu-catenari din diferite surse. De la stânga la dreapta: un polimer sintetic compus din lanțuri poli(U) și poli(A); ADN satelit de șoarece, care este un ADN mic; ADN din bacteriofagi MS-2 și T4; ADN de *Escherichia coli*; ADN de viței, fără fracțiunea mică nerepetitivă. Panta din punctul mediu de inflexiune al fiecărei curbe (marcat prin linie orizontală) indică heterogenitatea fragmentelor de ADN în soluție.

Tabelul 3.3. Tipuri de histone

Tip de histonă	Raport Lys/Arg	Număr de resturi de aminoacid	M_r (x 10^{-3})	
H1	20,00	215	21,00	
H2A	1,25	129	14,5	
H2B	2,50	125	13,8	Componente ale
H3	0,72	135	15,3	nucleozomilor
H4	0,79	102	11,3	

Structura nucleozomilor

Un comportament caracteristic al nucleului celulelor eucariote, spre deosebire de celulele procariote, este asocierea unor proteine mici, bazice cu ADN. Acestea se numesc histone. Tabelul 3.3. prezintă câteva caracteristici ale histonelor. Patru din cele cinci tipuri de histone se grupează în perechi pentru a forma o particulă în jurul căreia se înfășoară ADN. Aceasta particulă se numește nucleozom. Nucleozomii, care se formează aproximativ la fiecare 200 bp, însemnând că nucleul mediu al unei celule conține 25 de milioane de nucleozomi, formează un filament care se poate răsuci într-o structură helicoidală de tip solenoid. Fig. 3.12A arată sub formă de diagramă, aranjarea histonelor încercuite de două ori de 146 bp de ADN. La punctul de intrare și ieșire ADN se asociază cu o altă histonă, numită H1. Fig. 3.12B prezintă structura unui nucleozom reconstituit, recent determinată prin difracție cu raze X. ADN contactează octamerul histonic în 14 puncte principale, majoritatea dintre acestea având structuri diferite, astfel încât ADN nu urmează traiectorie regulată. Fiecare histonă este constituită dintr-un domeniu tri-elicoidal structurat, precum și două cozi nestructurate care se întind în spatele ADN. Aceste structuri pot juca un rol important în stabilirea contactelor cu nucleozomii adiacenți și reprezintă probabil locul unde histonele sunt modificate de către acetiltransferaze, care joacă un rol important în reglarea transcrierii. ADN din afara octamerilor a fost asemuit cu o piesă Velcro care poate fi deplasată puțin în cursul reacțiilor enzimatice implicate în replicarea ADN.



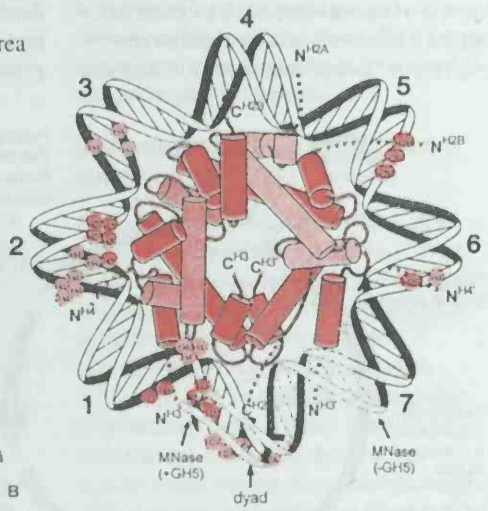


Fig. 3.12. Structura nucleozomilor. (A) Schița aranjării histonelor înconjurate de două ori de lanțul ADN. (B) Structura centrului nucleozomului la o rezoluție de 2,8 Å; este prezentată jumătate din structură. Este vizibilă o răsucire a ADN (73 bp) și imaginea este luată pe direcția sus-jos a axei superhelixului. Diferitele histone sunt indicate prin diferite nuanțe de roșu; regiunile helicoidale în proteine sunt reprezentate prin cilindri. Este indicat centrul nucleozomului (poziția dyad), cu terminare la situsul 7.

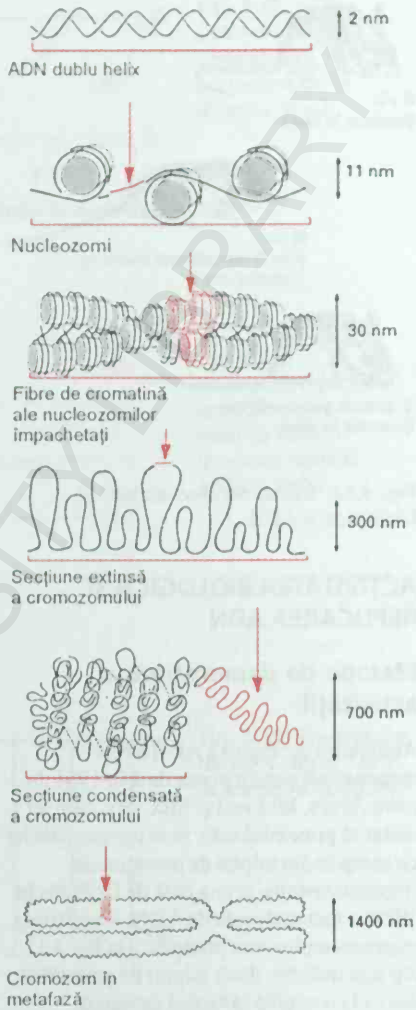


Fig. 3.11. Imaginea schematică a unui cromozom.

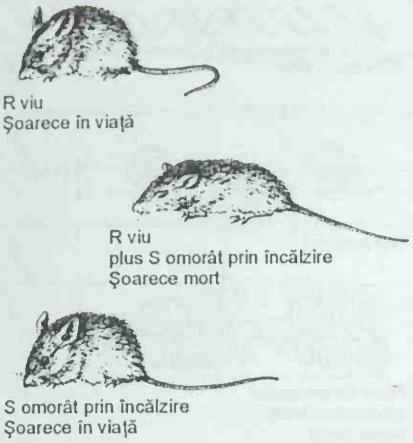


Fig. 3.13. Demonstrarea activităţii biologice a ADN.

ACTIVITATEA BIOLOGICĂ ŞI REPLICAREA ADN

Metode de demonstrare a activităţii

Activitatea biologică a ADN a fost demonstrată pentru prima dată în 1944 de către Avery, McLeod şi McCarty, care au arătat că principiul activ în experimentele lor cu extracte din tulpini de pneumococi (raportate pentru prima dată de Griffiths în 1928) a fost molecula de ADN. Rezultatele experimentelor sunt prezentate în fig. 3.13. Au fost utilizate două tulpini de pneumococi: (1) o tulpină sălbatică patogenă, cunoscută ca tulpina S („smooth") datorită coloniilor fine care conţin polizaharide în peretele celular şi (2), o tulpină mutantă nepatogenă R („rough") care nu conţine polizaharide în peretele celular pentru că lipseşte o enzimă esenţială. Un extract de tulpină S inactivată prin încălzire nu are efect mortal asupra unui şoarece, dar când a fost injectată împreună cu o tulpină R, şoarecele a murit. În plus, sângele şoarecelui mort a conţinut tulpină S de pneumococi vii. Astfel, extractul inactivat de tulpină S a transformat tulpina vie R (nepatogenă) în tulpină S vie (patogenă).

Din 1944, multe experimente au demonstrat rolul biologic al ADN şi chiar al ARN. Cele mai sofisticate dintre aceste experimente sunt descrise în secţiunea ADN recombinat (p. 45). Alte metode au folosit virusuri bacteriene (bacteriofagi sau fagi) şi virusuri de plante. ADN fagic poate infecta celula gazdă corespunzătoare şi induce liza acesteia ca rezultat al replicării fagului. Genomul virusului mozaicului tutunului este reprezentat de o moleculă de ARN, care este infecţioasă. Structura primară a proteinei de învelire a virusului rezultat depinde în mod esenţial de structura acidului nucleic infectant.

Ciclul celular

Toate celulele vii urmează fie un program de diviziune, fie o moarte programată, numită apoptoză (vezi capitolul 16). La celule eucariote se pot distinge două faze în timpul diviziunii celulare (prezentate în fig. 3.14): interfaza, perioadă în care celulele cresc şi mitoza, perioada în care nucleul şi restul celulei se divide. În termeni temporali, mitoza ocupă cam 40% din timpul total al celulelor embrionare timpurii şi mai puţin de 10% din timpul de viaţă al altor celule. Interfaza, descrisă în partea stângă a fig. 3.14 poate fi împărţită în trei „faze". În faza S (sinteză), cromozomii se replică şi are loc sinteza ADN. Masa celulară creşte continuu în timpul ciclului în timp ce conţinutul de ADN creşte pe durata fazei S şi scade brusc după faza S, astfel că ADN în celulele care nu se divid este constant. Faza S este precedată de faza G_1 („Gap" = spaţiu) şi urmată de o a doua fază „Gap", G_2. Ciclul are două puncte de decizie: la punctul D_1 (start) celula decide replicarea ADN, iar la D_2 celula decide iniţierea mitozei. Proteina Cdc2 a fost identificată ca principalul reglator al trecerii prin aceste două puncte. În punctul D_1 o celulă dormantă este în faza G_0. Celulele adulte, din al căror nucleu a fost obţinută clona oii Dolly au fost „inaniţiate" şi oprite în faza G_0. Acest studiu a arătat că într-o celulă diferenţiată nucleul îşi menţine ADN intact.

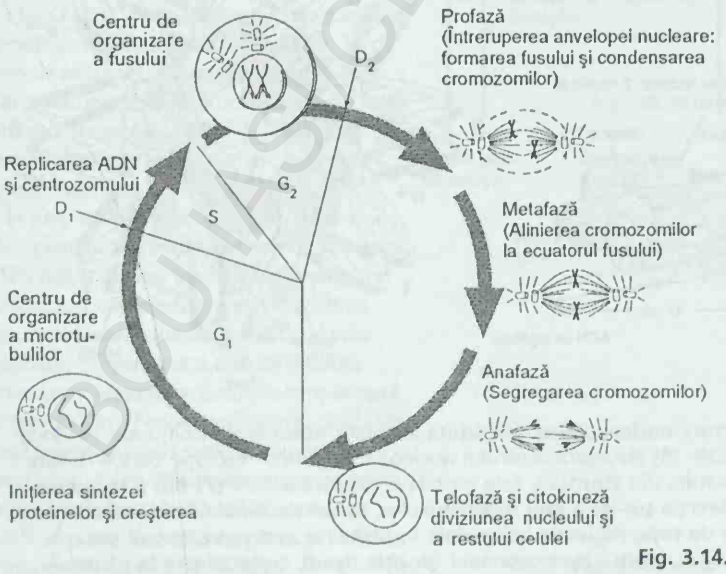


Fig. 3.14. Ciclul celular.

Replicarea semiconservativă *in vivo*

ADN se replică în celulă printr-un proces care asigură ca una dintre catenele parentale să fie prezentă în moleculele fiice, aşa-numita replicare semiconservativă. Experimentele care au demonstrat acest fapt au fost efectuate de Meselson şi Stahl şi sunt ilustrate în fig. 3.15. Aceşti cercetători au crescut *Escherichia coli* în prezenţa ^{15}N, izotopul greu al azotului. Ei au determinat densitatea ADN rezultat şi au arătat că după o generaţie densitatea a fost intermediară între densitatea ADN uşor (conţinând ^{14}N) şi a ADN greu (conţinând ^{15}N).

Replicarea ADN dublu-catenar

În celula vie, cel mai comun mecanism al replicării ADN este acela care are loc concomitent în ambele direcţii de-a lungul celor două lanţuri de ADN. În cel mai simplu caz al *E.coli*, desfacerea şi replicarea ADN circular dublu-catenar determină producerea unei structuri care se aseamănă cu un cerc cu o buclă internă, aşa cum se prezintă în fig. 3.16. În acest caz, replicarea porneşte dintr-un singur punct de iniţiere.

Enzime implicate în replicare

ADN este sintetizat de enzime numite ADN polimeraze, fiecare dintre acestea utilizând dezoxinucleozid trifosfaţi ca substraturi; polinucleotidul este sintetizat în direcţia 5'→3'. Caracteristicile importante sunt ilustrate în fig. 3.17. Matriţa de ADN este utilizată pentru a direcţiona ordinea bazelor azotate în polinucleotidul nou sintetizat care devine complementar cu ADN parental, aşa cum se vede în fig. 3.18.

Se cunosc trei tipuri de ADN polimeraze în *E.coli*. Se va arăta că, în timp ce ADN polimeraza III joacă rolul major în sinteză, ADN polimeraza I este de asemenea, importantă Fragmentele de ADN legate printr-o matriţă continuă sunt „lipite" prin acţiunea enzimei ADN ligaza (vezi fig. 3.19). Această enzimă joacă un rol atât în sinteza *in vivo* a ADN, cât şi în repararea unor rupturi monocatenare ale ADN. În celule animale, se formează ca intermediar un complex covalent enzimă-AMP. În bacterii, ATP este înlocuit de NAD^+.

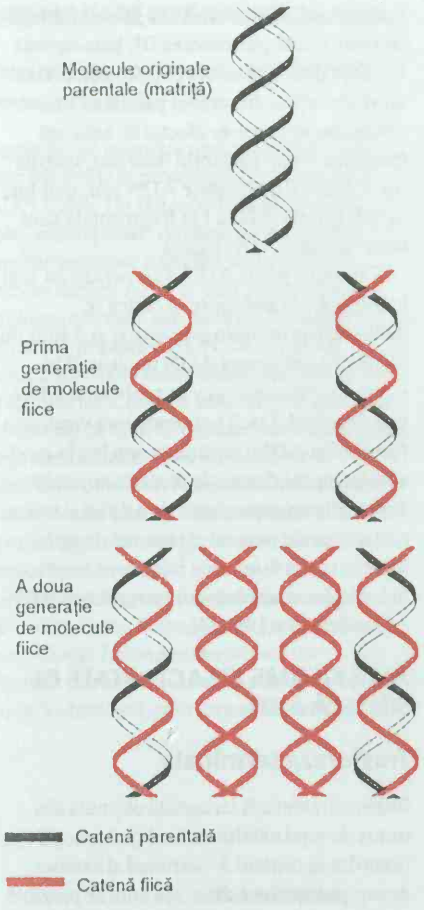


Fig. 3.15. Experimentul Meselson-Stahl care demonstrează replicarea ADN *in vivo* printr-un proces semiconservativ.

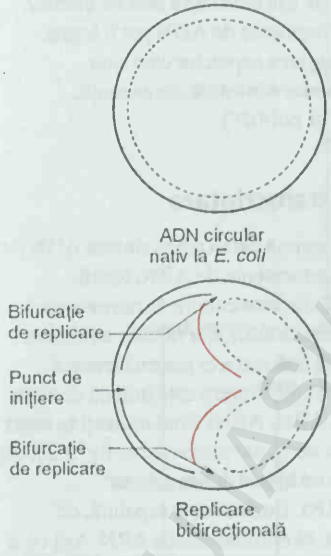
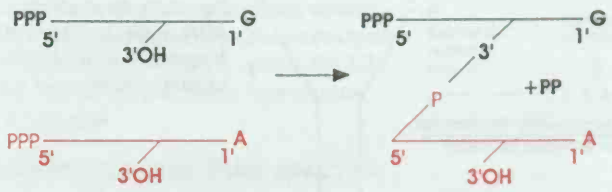


Fig. 3.16. Replicarea ADN dublu catenar în *Escherichia coli*.



Linia orizontală indică prezența deoxiribozei și a numărului de identificare a carbonului din glucid.

Fig. 3.17. ADN polimerazele sintetizează plinucleotide în direcția 5'→3'.

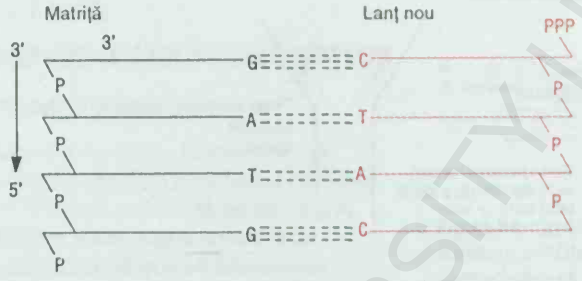


Fig. 3.18. Polinucleotidul este sintetizat pe o matriță ADN și produce lanțuri antiparalele.

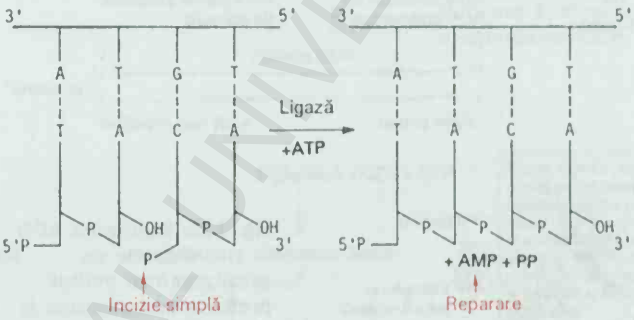


Fig. 3.19. Fragmente de ADN „lipite" prin acțiunea ADN ligazei

Replicarea ADN dublu-catenar

Pentru a explica creșterea aparentă a ambelor catene ale ADN în aceeași direcție în timp ce enzimele sintetizează noi catene numai într-o direcție, și anume 5'→3', s-a postulat că una dintre catene a fost întâi sintetizată în fragmente. Mecanismul este prezentat în fig. 3.20. Când ADN a fost examinat la scurt timp după startul sintezei, au fost găsite mici fragmente, numite Okazaki după numele celui care le-a descoperit.

Rolul ARN în biosinteza ADN

Pare surprinzător că pentru sinteza ADN este necesară sintetizarea de către celulă a ARN. O enzimă specifică, primaza, este implicată, așa cum se vede în fig. 3.21. Sinteza oricărei molecule de ADN este inițiată prin sinteza unui lanț scurt de ARN, din nou în direcția 5'→3', folosind nucleozid trifosfați (NTPs) ca substrat. Enzima este selectivă privind situsul de inițiere a sintezei. În catena conducătoare, numai o amorsă este sintetizată. În catena întârziată, sunt implicate multe locuri de initiere pe măsură ce cele două catene ale ADN parental se separă. Amorsa ARN este eliminată de către ADN polimeraza I și spațiile lipsă („gaps") sunt umplute prin acțiunea aceleiași enzime. Fragmentele sunt unite de ADN ligază. Acest mecanism duce la probleme legate de replicarea capetelor cromozomilor, numite telomere. Rezolvarea acestei probleme prin acțiunea telomerazei este prezentată în Capitolul 16.

Sistemul multienzimatic pentru sinteza ADN

Enzimele și proteinele care acționează în furca de replicare bidirecțională a ADN în *E.coli* sunt ilustrate în fig. 3.22. Cel puțin 15 proteine de replicare (corespunzând la peste 30 de polipeptide) au fost caracterizate. Proteina dnaA se leagă la ADN după care se atașează la un complex al proteinelor dnaB și dnaC. dnaB este o helicază care catalizează dezrăsucirea lanțului dublu catenar, dependent de energia ATP. Porțiunea monocatenară liberă a ADN este apoi stabilizată de proteinele de legare SSB („Single-Stranded Binding protein"). O amorsă ARN este sintetizată de către primază într-un ansamblu multisubunitar numit primozom. La terminarea replicării amorsa va fi eliminată de către ADN

BUCUREȘTI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

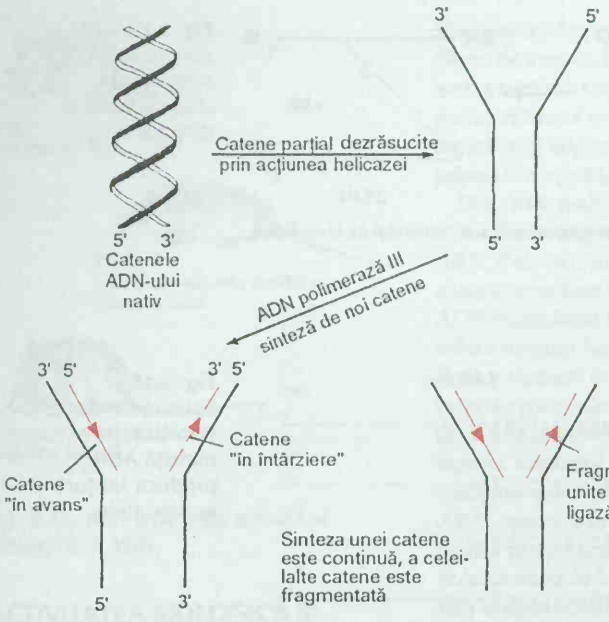


Fig. 3.20. Replicarea ADN implică sinteza de fragmente Okazaki în catena discontinuă.

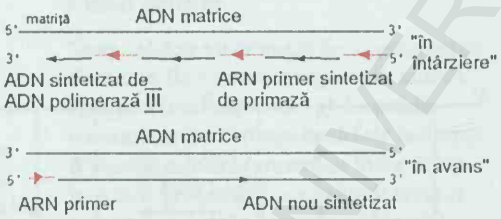


Fig. 3.21. Replicarea ADN implică, de asemenea și sinteza ARN.

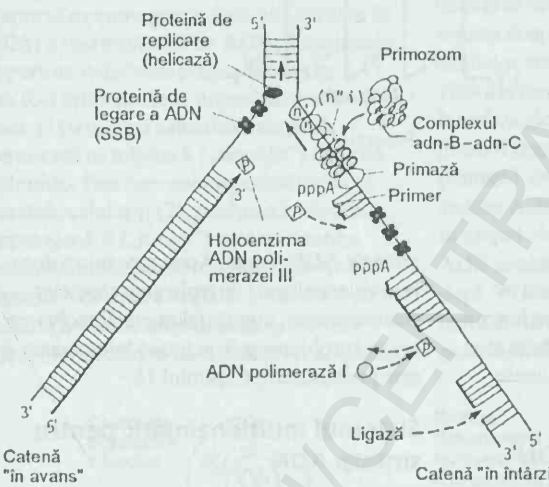


Fig. 3.22. Replicarea ADN *in vivo* depinde de activitatea mai multor proteine care participă la sistemul multienzimatic.

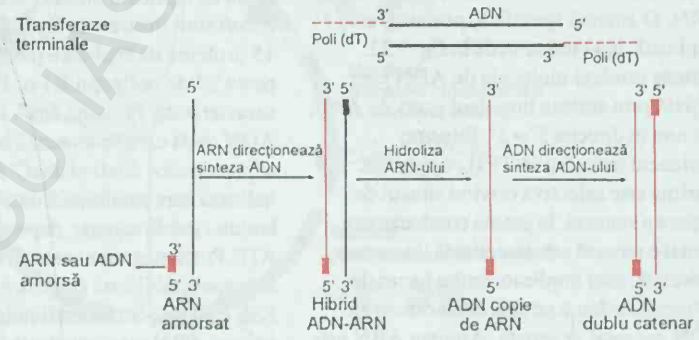


Fig. 3.23. Două enzime cu activitate de sinteză ADN. Transferaza terminală adaugă fragmente nucleotidice la capătul ADN (sus). Transcriptaza inversă (jos) transcrie secvența de baze a ARN la ADN.

polimeraza I. Un nou ADN este sintetizat de către ADN polimeraza III, holoenzimă formată din opt lanțuri polipeptidice. ADN aflat din fața polimerazei pe catena conducătoare nu este afectat de helicază (proteina Rep). Pe lanțul întârziat, spațiile lipsă dintre fragmentele ADN sunt umplute de ADN polimeraza I și fragmentele sunt unite de către ADN ligaza.

Cel puțin patru ADN polimeraze au fost identificate la eucariote. Acestea se denumesc prin litere grecești: α și δ sunt implicate în replicarea ADN nuclear, β în sinteză și reparare, și γ în replicarea ADN mitocondrial. Dacă genomul unui virus este format din ADN, replicarea are loc în mod similar cu cel descris la o celulă normală. Virusurile au capacitatea de a dirija și utiliza metabolismul normal al unei celule astfel încât în cazul fagilor de liză, de exemplu, infecția cauzează înlocuirea replicării ADN cu replicarea ADN fagic.

ALTE ENZIME CU ACTIVITATE DE SINTEZĂ ADN

Trasferaza terminală

Enzima trasferază terminală obținută din timus de vițel catalizează adiția homopolimerilor la capătul 3'-terminal al catenei dezoxipolinucleotidice, așa cum se prezintă adiția poli(dT) în fig. 3.23. Poli(dA), poli(dC) și poli(dG) pot fi adăugate, de asemenea. Aceasta enzimă este în mod deosebit folositoare în formarea ADN recombinat, așa cum se va descrie ulterior. Diferite fragmente de ADN pot fi legate după adăugarea capetelor care sunt complementare între ele, de exemplu, poli(dA) și poli(dT).

Revers transcriptaza

Această enzimă catalizează sinteza ADN pe un lanț monocatenar de ARN. Rolul fiziologic al aceste enzime în retrovirusuri va fi descris ulterior, dar rămâne extrem de importantă utilizarea ei pentru clonarea ADN. Din nou, sinteza este inițiată de către o amorsă ARN, ARNt fiind utilizați în acest scop. Așa cum este prezentat in fig. 3.23, se formează un hibrid dublu catenar ADN-ARNt. Enzima este capabilă, de asemenea, să elimine catena ARN. Așa cum se va arăta ulterior, această enzimă este utilă în tehnologia ADN recombinat, în mod deosebit în legătură cu sinteza ADN complementar (ADNc) în care se sintetizează o copie a ARNm.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITARA

ENZIME CARE DEGRADEAZĂ ADN

Enzime de restricţie: acţiune şi nomenclatură

Enzimele de restricţie reprezintă calea prin care bacteriile se protejează de molecule de ADN străin. Un fag infectant se spune că este „restricţionat" de către gazdă. Aceste enzime recunosc o anume secvenţă ţintă într-un duplex ADN şi sunt prin urmare, mijloace esenţiale atât pentru determinarea structurii primare a ADN cât şi pentru tehnologia ADN recombinat, aşa cum se va arăta ulterior. Cele mai utile enzime sunt cele cunoscute ca tipul II, din care câteva sute sunt deja caracterizate, fiind izolate dintr-o varietate de bacterii. Nomenclatura utilizată pentru aceste enzime este următoarea: numele speciei organismului gazdă identificat din prima literă a numelui genului şi primele două litere ale epitetului specific până la abreviere de trei litere. Astfel *Escherichia coli=Eco* şi *Haemophilus infuenzae = Hin*. Tulpina sau identificarea tipului este dată de o literă ulterioară, prin urmare *Hin*d. Datorită simetriei secvenţei de recunoaştere, enzima de restricţie poate genera fragmente cu capete mutual coezive, aşa cum se arată în fig. 3.24 (A). Alte enzime pot genera fragmente cu capete netede.

Alte enzime hidrolitice specifice

Nucleaza S1 degradează orice regiune care nu are număr par de baze azotate în lanţul ADN. Este deosebit de util acest fapt pentru eliminarea nucleotidelor de la capetele lanţurilor lipite, aşa cum se arată în fig. 3.24 (B).

METABOLISMUL NUCLEOTIDELOR

Principii generale

Aşa cum am văzut, dezoxinucleozid trifosfaţii (dNTPs) şi nucleozid trifosfaţii (NTPs) sunt substraturi pentru sinteza ADN şi ARN, şi prin urmare orice schimbare în disponibilitatea acestor substraturi afectează sinteza ADN şi a ARN. Căile metabolice pentru metabolismul nucleotidelor sunt arătate în fig. 3.25.

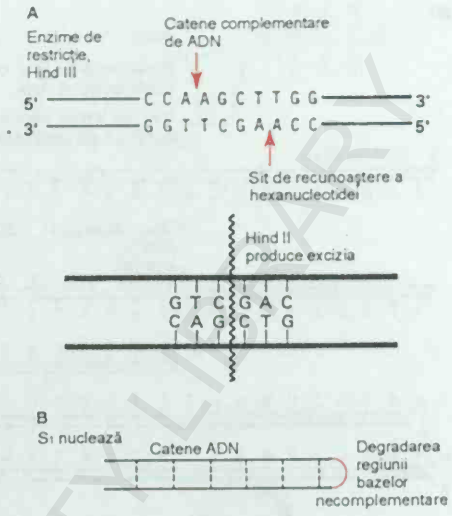


Fig. 3.24. Două tipuri de enzime de scindare a ADN. A. Enzime de restricţie care scindează ADN în locuri specifice. Acestea pot genera fie fragmente cu capete mutual coezive (sus) sau fragmente cu capete netede (jos). B. Nucleaza S_1 elimină lanţurile de ADN necomplementare.

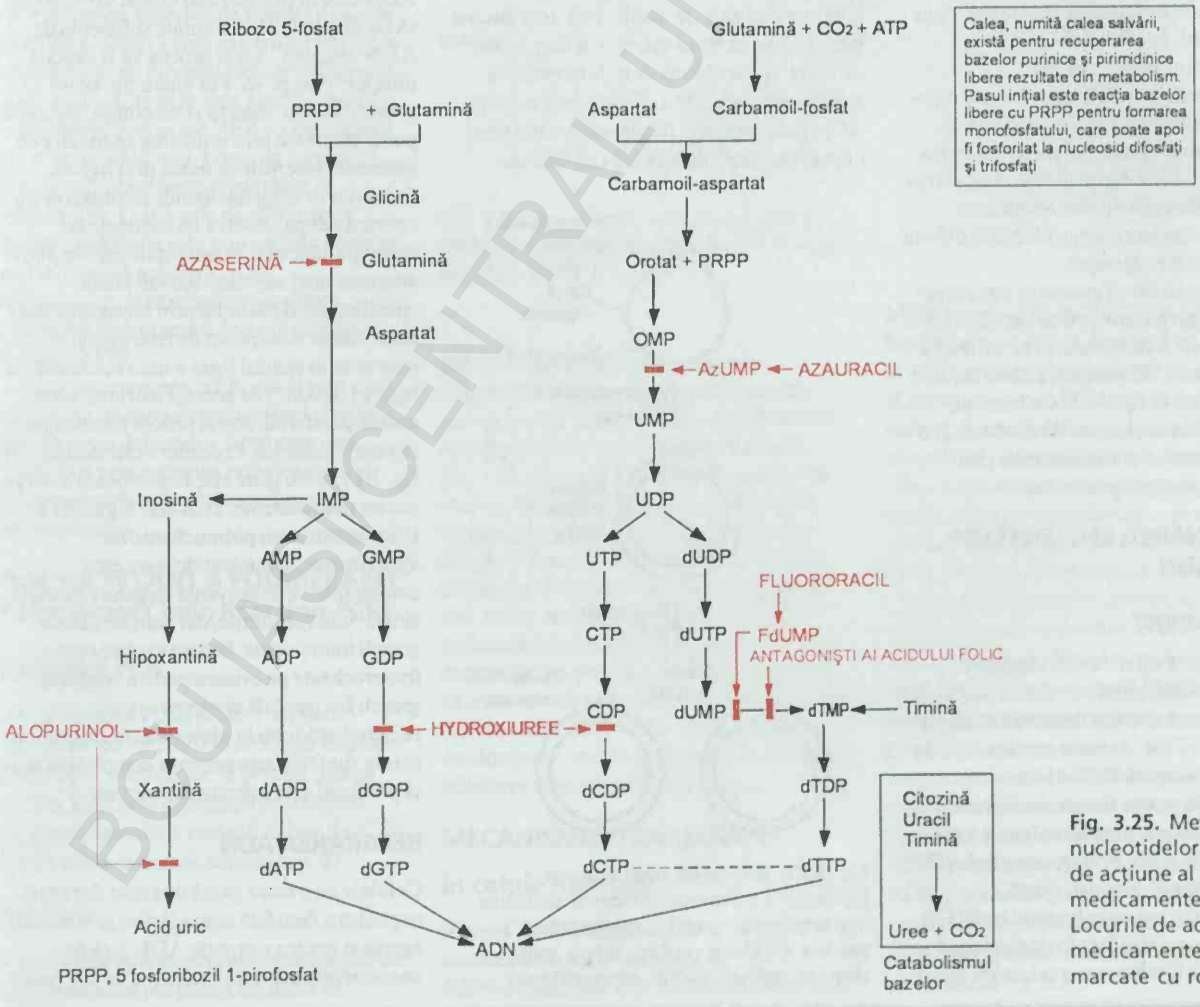


Fig. 3.25. Metabolismul nucleotidelor arată locul de acţiune al medicamentelor. Locurile de acţiune ale medicamentelor sunt marcate cu roşu.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

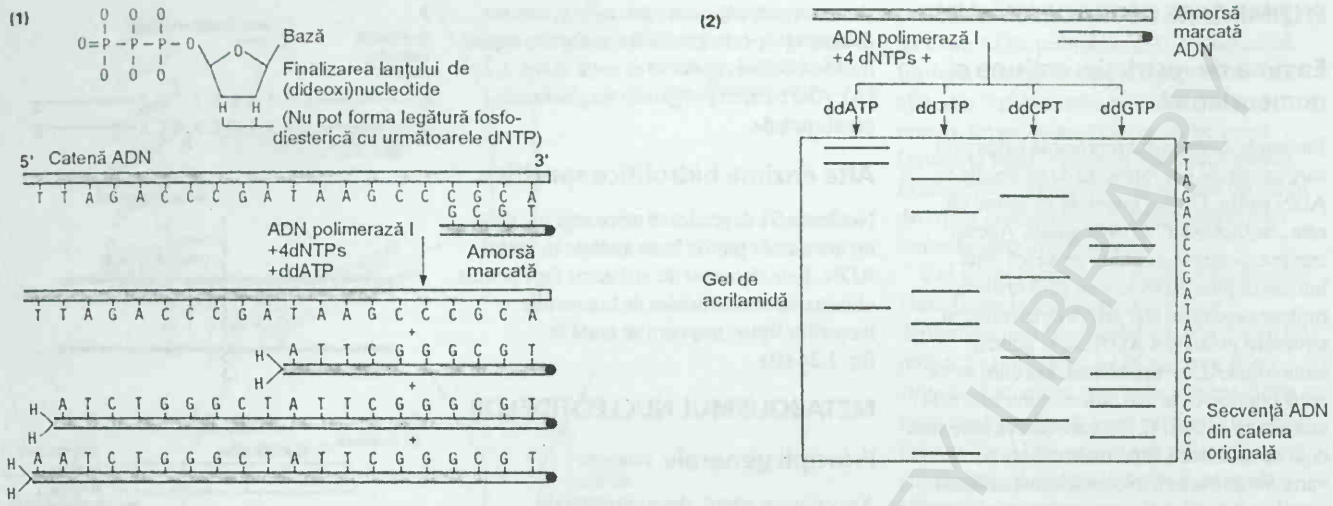


Fig. 3.26. Determinarea secvenței de baze din ADN prin metoda didezoxinucleotidică Sanger.

Acțiunea medicamentelor

Diferite medicamente care interferă cu sinteza nucleotidelor au fost utilizate pentru diferite scopuri, astfel sunt antibioticele în chemoterapia cancerului și în tratamentul gutei. Punctele de atac ale unora dintre aceste medicamente sunt arătate în fig. 3.25. Coenzimele folat (vezi p. 96) sunt implicate în diferite puncte și pot fi inhibate de antagoniștii folatului, cum este de exemplu fluorouracilul. În conversia dUMP la dTMP, donorul metil este N^5, N^{10}-metilentetrahidrofolat; acesta este regenerat de dihidrofolat reductaza, care este inhibată de aminopterină și metotrexat. Bazele purinice libere formate prin degradarea acizilor nucleici și a nucleotidelor sunt convertite la nucleotide purinice prin diferite căi de salvare (recuperare).

Trebuie remarcat că guta care este caracterizată prin nivele crescute ale acidului uric în sânge, poate fi diminuată prin utilizarea medicamentului allopurinol, a cărui acțiune este prezentată în fig. 3.25. Ca rezultat, apare o reducerea sintezei de acid uric și o creștere a excreției componentelor mai solubile, xantina și hipoxantina.

DETERMINAREA SECVENȚEI DE BAZE ÎN ADN

Metoda Sanger

Au fost utilizate diferite metode pentru determinarea secvenței de baze în ADN, dar cea mai comună este cea definită de Sanger și colaboratorii săi. Aceasta este ilustrată în fig. 3.26. Se prepară 2',3'-didezoxinucleotidele pentru fiecare dintre cele patru baze azotate. Aceste molecule sunt incorporate în ADN prin intermediul ADN polimerazei din *E.coli*, dar, odată incorporată, didezoxinucleotidul (ddNTP) nu poate forma o legătură fosfodiesterică prin atașare la următoarea nucleotidă dNTP și astfel se oprește creșterea lanțului. Amestecul de reacție constă dintr-o catenă de ADN, o amorsă marcată de ADN care este complementară cu capătul acestei catene, având un raport bine controlat al unui nucleotid specific ddNTP față de dNTP normal și trei alte dNTPs. Dacă se alege corect raportul ddNTP / dNTP, vor rezulta serii de catene marcate, a căror lungime depinde de localizarea unei anume baze față de capătul ADN. Un lanț ADN care trebuie secvențializat, împreună cu amorsa marcată este divizat în patru reacții ADN polimerazice, fiecare conținând unul dintre cele patru ddNTPs. Fragmentele marcate rezultate sunt separate în funcție de mărime prin electroforeză pe gel.

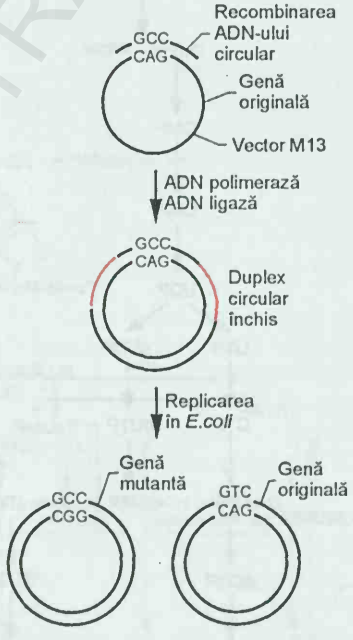


Fig. 3.27. Utilizarea unei amorse („primer") oligonucleotideice sintetice imperecheate greșit („mismatched") pentru a induce mutații într-o genă clonată într-un vector monocatenar.

MUTAGENEZA *IN VITRO*

Mutageneza *in vitro* este definită ca proces de inducere a unor schimbări specifice în secvența de ADN *in vitro*, cu scopul de a defini efectul secvenței asupra funcției. ADN este în primul rând clonat astfel încât să fie disponibilă o cantitate suficientă de ADN omogen. Acest proces va fi descris ulterior, vezi p. 46. Pot apare trei tipuri de alterări: deleții, inserții și substituții. Delețiile pot fi efectuate prin utilizarea enzimelor de restricție. Inserțiile se induc prin ligarea linkerilor de oligonucleotide în situsurile de restricție după clivarea cu enzimele de restricție adecvate. Substituțiile care implică alterarea unei secvențe într-un punct specific, pot fi obținute prin efectuarea unei mici deleții la un punct de restricție și inserarea în spațiul lipsă a unui nucleotid de legare („linker") de aceeași mărime, dar cu secvență diferită. Acest proces este denumit inginerie proteică. Procedura este descrisă în fig. 3.27, unde gena este întâi clonată într-un vector monocatenar, cum este fagul M13. Este sintetizat un polinucleotid de aproximativ 20 nucleotide, care este complementar în secvență cu gena clonată la situsul mutației dorite, dar conține câteva greșeli intenționate. Bazele azotate corect împerecheate pe oricare parte a zonei cu greșeli fac posibilă alinierea polinucleotidului la plasmidă. ADN polimerazele sunt utilizate pentru a completa cercul și produsul este introdus în bacterii.

REPARAREA ADN

Celulele au o mare gamă de kituri de reparare pentru a face față degradărilor prin diferiți agenți și pentru a proteja ADN față de consecințele acestora. Iradierea cu UV poate

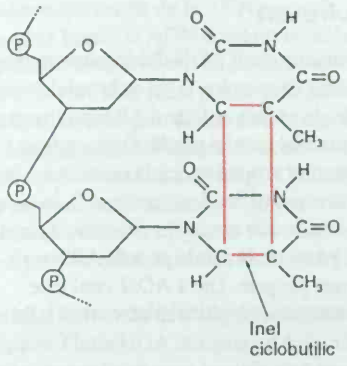


Fig. 3.28. Dimerul ciclobutiltimină. Legăturile covalente lungi de 1,6 Å care leagă ciclurile timinei (roșu) sunt mult mai scurte decât spațiul normal (3,4 Å) între ciclurile fixe din ADN-B, în acest fel ADN fiind distorsionat local.

determina formarea așa-numiților dimeri pirimidinici. Aceasta structură este ilustrată în fig. 3.28. Acești dimeri pirimidinici pot fi eliminați prin ADN fotoliaze sau prin procesul cunoscut sub numele de reparație nucleotidică cu excizie (NER- Nucleotide Excision Repair) care are relevanță la om. În boli genetice rare, cum este *Xeroderma pigmentosum*, celulele epiteliale sunt incapabile de a repara leziunile induse de UV. Persoanele suferind de această maladie autozomal recesivă sunt extrem de sensibile la lumina solară. Fibroblastele epiteliale cultivate de la aceste persoane sunt incapabile de procesul de reparare NER cu eliminarea dimerilor pirimidinici. (vezi, de asemenea, gene tumor-supresoare prezentate în capitolul 16). O altă cale de eliminare a bazelor modificate este prin excizia acestora; aceasta implică acțiunea ADN glicozilazelor, care scindează legătura glicozidică lăsând restul deoxiribozei în scheletul ADN.

Atât prin repararea NER, cât și prin excizia bazelor, endonucleazele extind eliminarea și în urma defectului, lipsă care este completată prin acțiunea polimerazei I și refacerea legăturii fosfodiesterice prin acțiunea ligazei.

REACȚIA ÎN LANȚ A POLIMERAZEI (Polymerase Chain Reaction-PCR)

Utilizarea PCR

Prin intermediul PCR, poate fi obținută o amplificare de 10-100 000 ori a unui fragment dat de ADN. Metoda are în prezent o largă aplicare, îndeosebi în diagnosticul medical unde sunt disponibile cantități infime de ADN Acest lucru este descris detaliat la p. 47.

Principii

Pe baza cunoașterii secvențelor nucleotidice care flanchează porțiunea de ADN ce

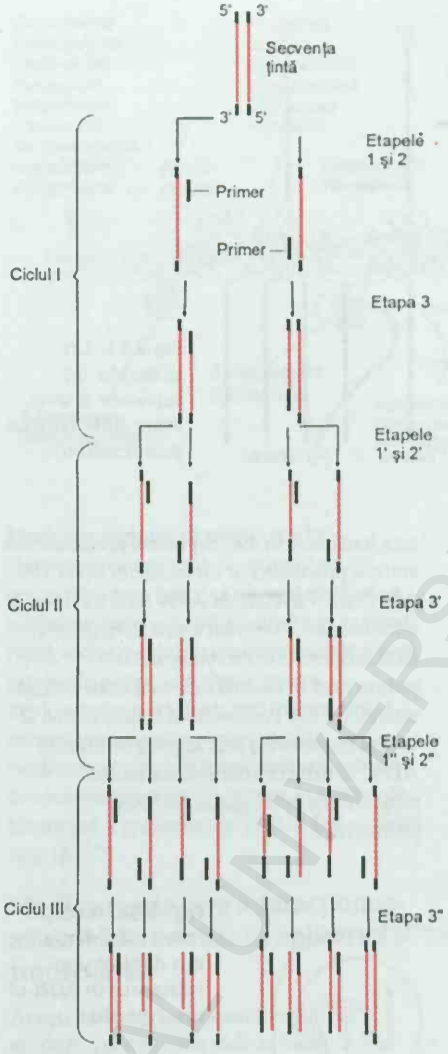


Fig. 3.29. Reacția în lanț a polimerazei (PCR) permite amplificarea după dorință a lungimii dorite de ADN.

trebuie amplificată, sunt preparate oligonucleotidele complementare acestor secvențe. ADN care trebuie amplificat este denaturat termic, așa cum este ilustrat în fig. 3.29., în etapa 1 și aliniat la amorse în etapa 2. Elongarea lanțului nou sintetizat începe de la capătul 3' al fiecărei amorse (etapa 3). Cicluri ulterioare de denaturare, aliniere și elongare a amorsei se repetă de mai multe zeci de ori. Utilizând o ADN polimerază termostabilă (Taq), care nu este distrusă la temperatura de denaturare termică, este evitată adiția de enzimă proaspătă la fiecare ciclu. Automatizarea acestui proces de elongare – reciclare se poate realiza prin utilizarea unei aparaturi specifice.

MECANISMUL TRANSCRIERII

În celule normale

Sinteza ARN utilizând matrița de ADN este catalizată de ARN polimeraze ADN-dependente care utilizează nucleozid

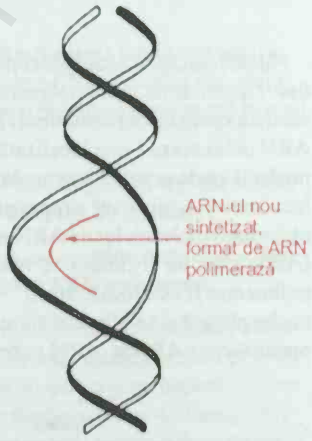


Fig. 3.30. Transcrierea ADN în ARN implică separarea lanțurilor de ADN și acțiunea ARN polimerazei ADN-dependente.

trifosfați ca substraturi și catalizează sinteza lanțurilor de ARN în direcția 5'→3', la fel ca și ADN polimerazele. Numai un singur lanț al dublului helix ADNc este utilizat ca matriță. Întrucât dubla catenă a ADN este conservată, sinteza ARN este descrisă ca fiind conservativă, dar întrucât se produce numai un lanț polinucleotidic, ea este asimetrică. Catena de ADN utilizată ca matriță este cunoscută sub numele de catenă-matriță sau catenă antisens, în contrast cu cealaltă catenă care este cunoscută ca și catenă codificatoare sau catenă sens. Secvența de baze a ARN sintetizat va fi identică față de catena codificatoare, cu mențiunea că uracilul înlocuiește timina. ARN polimerazele sunt enzime multisubunitare mari și complexe care au capacitatea de a identifica locul în care este inițiată sinteza ARN pe matrița ADN. Spre deosebire de ADN polimeraze, ele nu au nevoie de amorsă. Cele două catene de ADN se separă la locul de inițiere a sintezei, așa cum este prezentat în fig. 3.30.

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITY LIBRARY

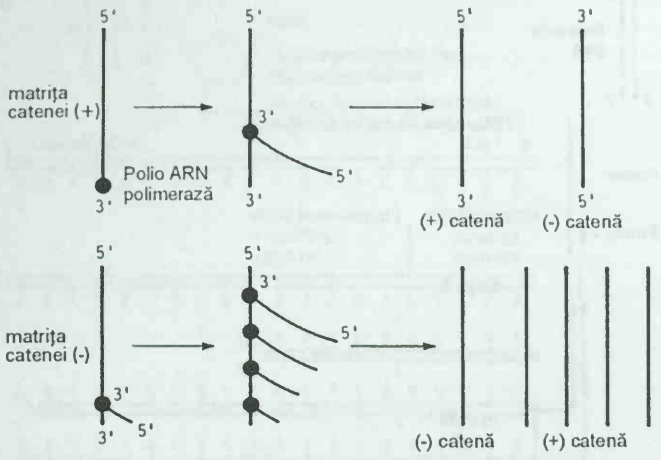


Fig.3.31. Un exemplu de replicare a unui virus ARN (virusul poliomelitei).

Nucleii celulelor eucariote conţin trei tipuri distincte de ARN polimeraze care pot cataliza sinteza diferitelor tipuri de ARN. ARN polimeraza I este localizată în nucleoli, unde genele ribozomale sunt localizate şi catalizează sinteza precursorilor majorităţii moleculelor de ARN ribozomal (ARNr), dar nu şi sinteza 5S ARNr. ARN polimeraza II este localizată în nucleoplasmă şi catalizează sinteza precursorilor ARNm. ARN polimeraza III este localizată în nucleoplasmă şi catalizează sinteza precursorilor moleculelor 5S ARNr, ARNt şi o varietate de ARN mici nucleari şi citoplasmici. Controlul transcrierii genelor structurale este exercitat prin ARN polimeraza II, enzimă care va fi caracterizată ulterior (p. 39). Antibioticul actinomicină D inhibă transcrierea prin legarea de matriţa ADN, in timp ce rifampicina inhibă transcrierea prin legarea de ARN polimerază.

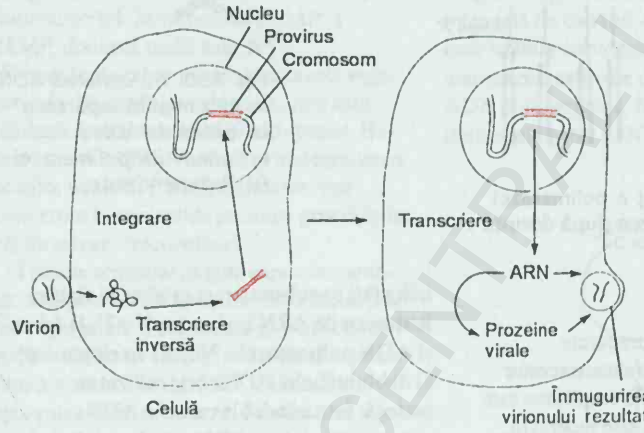


Fig. 3.32. Incorporarea informaţiei din ARN-ul unui retrovirus în ADN-ul unei gazde.

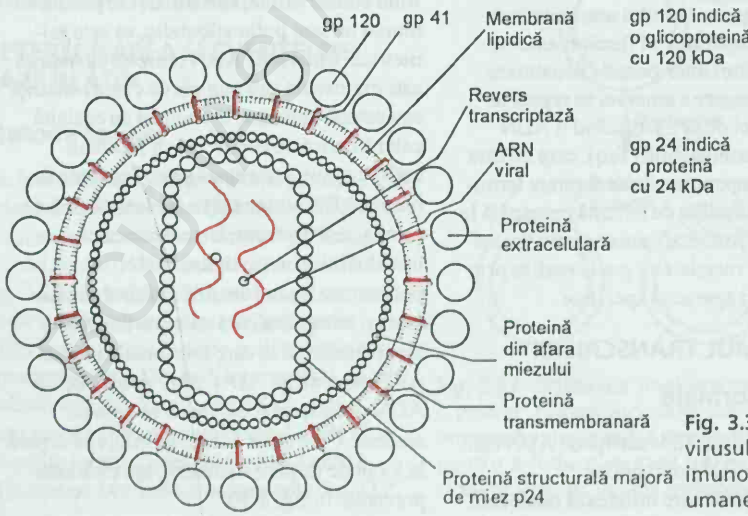


Fig. 3.33. Structura virusului imunodeficienţei umane (HIV-1).

În virusuri

La virusurile cu ADN dublu catenar, transcrierea va avea loc la fel ca în celulele normale, de obicei utilizând ARN polimeraza din nucleul celulei gazdă. O excepţie o reprezintă virusul vaccinia care determină boala vărsatul vacilor(„cowpox"). În acest caz, replicarea are loc în citoplasmă deoarece particulele virale posedă ARN polimeraza proprie. Dacă ADN viral este monocatenar, replicarea sa implică o formă replicativă bicatenară, ADN viral fiind obţinut prin sinteza asimetrică numai a unei singure catene dintre cele două.

În anumite cazuri, genomul virusului este reprezentat de ARN, care apare în două forme. Dacă ARN serveşte ca ARNm, este notat (+). Un astfel de exemplu este virusul poliomelitei. Calea prin care acest virus replică multe catene (+) este prezentată în fig. 3.31. Polimeraza implicată este o proteină formată din patru subunităţi, numai una dintre ele fiind virus-specifică, celelalte subunităţi fiind oferite de către celula gazdă. Dacă ARN viral este (-), celula gazdă nu îl poate replica şi virionul trebuie să poarte o replică pentru a forma catene (+) ce servesc ca ARNm. Exemple de astfel de virusuri: influenza, pojar, rabie.

TRANSCRIEREA INVERSĂ

Principii generale

Virusurile care cauzează cancerul, numite şi virusuri oncogene, pot avea genom reprezentat fie de ADN, fie de ARN. Exemple de astfel de virusuri sunt: virusul polioma, virusul simian SV40, virusul Epstein- Barr (EBV). Virusurile ARN sunt cunoscute ca retrovirusuri; ele sunt singurele virusuri ARN care produc cancer şi sunt denumite virusuri oncorna (ARN oncogenic). Ele acţionează fie prin introducerea unei oncogene în ADN gazdă, determinând sinteza de proteine modificate, fie prin sinteza unei cantităţi excesive de proteine normale care joacă un rol cheie în reglarea creşterii (vezi de asemenea p. 204). Celulele normale se spune că se transformă în celule neoplazice, care nu numai că se divid mai repede decât cele normale, dar sunt şi imortale (nemuritoare). Celulele normale conţin gene care pot suferi mutaţii (adesea printr-o simplă schimbare de bază azotată) pentru a induce cancer; asemenea gene sunt numite protooncogene, care spre deosebire de oncogene, conţin introni (vezi p. 37). Este posibil ca oncogenele virale să fi derivat din protooncogene. Pare surprinzător că sinteza ADN a fost esenţială pentru propagarea virusurilor oncorna. S-a descoperit atunci că structura ARN-ului lor a fost integrată în genomul gazdă şi că o ADN polimerază direcţionată de ARN, cunoscută ca revers transcriptază a fost implicată. Ideea

că informaţia venită de la ARN poate fi transmisă înapoi la ADN a apărut iniţial ca şi contradictorie în raport cu dogma centrală a lui Francis Crick (vezi p. 18) privind transferul informaţiei, dar nu este în realitate aşa. Mecanismul de acţiune al revers transcriptazei este ilustrat în fig. 3.23. calea prin care secvenţa de baze a ARN viral este copiată în cromozomul gazdă devenind astfel un provirus, este ilustrată în fig. 3.32.

Virusul imunodeficienţei umane (HIV)

Structura virusului imunodeficienţei umane (HIV), retrovirus care este agentul patogen al sindromului imunodeficienţei dobândite (AIDS) este arătată în fig. 3.33. Virionul HIV are aproximativ 100 nm diametru. Distribuţia diferitelor proteine este de asemenea arătată. HIV intră în limfocite T4 prin interacţiunea gp120 cu receptorul CD4 din membrana plasmatică, deşi un receptor pentru „chemokine" numit CCR5 este necesar pentru intrarea virusului în stadiile incipiente ale infecţiei. Miezul viral pătrunde în citosolul celulei gazdă, fapt ce determină distrugerea limfocitelor T4, componente vitale ale răspunsului imun. Structura primară a gp120 suferă mutaţii rapide care fac dificilă prepararea unui vaccin eficient. Produsul traducerii primare a provirionului este o poliproteină care necesită o scindare proteazică. Multe medicamente acţionează prin inhibarea acestei proteaze.

ACŢIUNEA ANTIBIOTICELOR ŞI A ANTIMETABOLIŢILOR ASUPRA REPLICĂRII ŞI TRANSCRIERII

Principii generale

Procesul replicării şi al transcrierii sunt cu certitudine ţinte potenţiale importante de acţiune a medicamentelor, fie pentru protecţia celulelor eucariote faţă de acţiunea bacteriilor şi a virusurilor, fie pentru inhibarea creşterii celulelor neoplazice. Uneori este nevoie a proteja celulele animale faţă de acţiunea altor celule aucariote cum sunt fungii sau ciupercile (de exemplu drojdiile), protozoarele şi amoebele, dar aceste interacţiuni pun probleme întrucât ele au un metabolism comun cu eucariotele. În principiu, este mai uşor a inhiba diferenţiat creşterea bacteriilor. Un exemplu este acţiunea rifampicinei, care inhibă transcrierea ADN bacterian prin interacţiune cu ARN polimeraza, dar are efect minor asupra transcrierii la eucariote. Virusurile prezintă probleme, întrucât aşa cum am văzut, utilizează metabolismul normal al celulei gazdă, deci este dificil a concepe medicamente antivirale netoxice. Acyclovir, şi într-o anumită măsură AZT, au avut succes în acest sens şi acţiunea lor este descrisă mai jos.

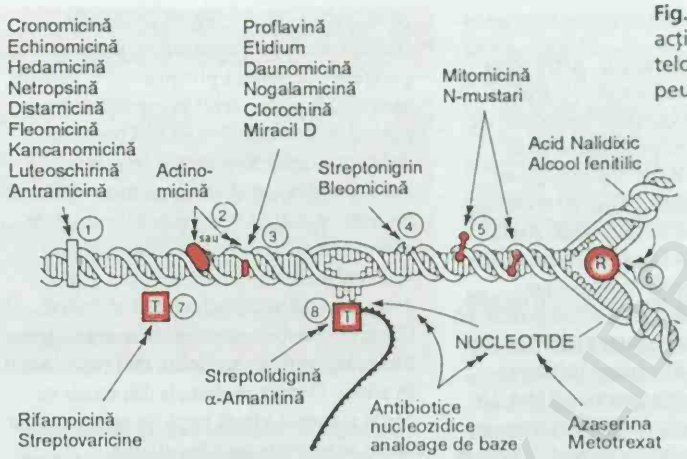


Fig. 3.34. Localizarea acţiunii medicamentelor chemoterapeutice.

Medicamentele care sunt utilizate în chemoterapia cancerului sunt mai degrabă nespecifice prin faptul că ele sunt destinate a inhiba creşterea celulară a celulelor ce se divid rapid, inclusiv celulele din mucoasa intestinală şi foliculii piloşi. Toxicitatea acestor medicamente poate fi limitată într-o anumită măsură prin amestecarea mai multor medicamente, în care fiecare componentă este în concentraţie mică. Inhibitorii unor etape de biosinteză a precursorilor ADN a fost descrisă deja (p. 25).

Medicamente care interacţionează cu ADN, inhibând replicarea şi transcrierea

Aceşti inhibitori acţionează în diferite moduri, aşa cum este indicat în fig. 3.34.

1. Medicamente care leagă necovalent ADN-ul prin mecanisme necunoscute şi împiedică replicarea.
2. Actinomicina D se leagă de ADN fără distorsionarea structurii de dublu helix dar împiedică transcrierea; doxorubicina (Adriamicina), Cronomicina A şi Distamicina acţionează similar.
3. Substanţele care se leagă de ADN cu distorsionarea catenelor de ADN.
4. Medicamente care rup catenele ADN
5. Substanţele „nitrogen mustard" şi mitomicina C sunt agenţi alchilanţi tipici şi determină reticularea (cross-linkarea) a catenelor de ADN; clorambucilul, ciclofosfamida şi bisulfanul acţionează în mod similar.
6. Substanţe care împiedică replicarea prin legare la furculiţa de replicare
7. După cum s-a menţionat mai sus, rifampicina inhibă ARN polimeraza
8. α-Amanitina din ciuperci inhibă polimeraza II eucariotă; medicamentele pe bază de platină, cisplatin şi carboplatin, induc ambele reticularea (cross-linkarea) inter- sau intracatenară; hexametilmelamina şi dacarbazina (DTIC) metilează ADN.

Medicamente antivirale

Aciclovirul (acicloguanozina) este un derivat de guanină care este fosforilat în celulele infectate cu virusul herpesului, mai rapid decât celulele neinfectate, datorită acţiunii unei timidin kinaze herpes-specifice. Produsul, acicloguanozintrifosfat, inhibă ADN-polimeraza virusului herpetic mai eficient decât ADN-polimeraza celulei gazdă. AZT (zidovudina) (3'-azido-3-deoxitimidina) suferă fosforilare în celule T umane rezultând nucleozid 5'-trifosfat care intră în competiţie cu TTP şi serveşte ca inhibitor terminator de catenal revers-transcriptazei HIV. Structurile compuşilor Aciclovir şi AZT sunt prezentate în fig. 3.35.

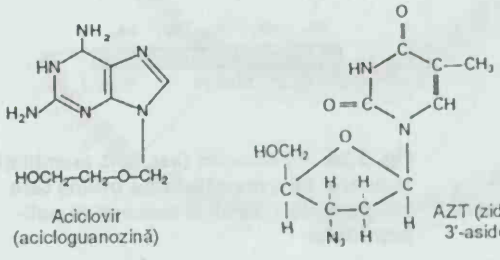


Fig. 3.35. Structurile a două medicamente antivirale: Aciclovir şi AZT.

ARN antisens

Este definit ca un transcript ARN scurt care a pierdut capacitatea de a fi tradus, dar are un înalt grad de complementaritate cu alt ARN care le permite ambilor să se hibridideze. Acest ARN antisens poate acționa ca un represor al functiei normale sau al exprimării unui ARN țintă. Astfel, ARN antisens a fost transferat unor celule pentru a inhiba specific sinteza unei proteine. În anumite cazuri a fost posibil ca să crească cantitatea de catene codificatoare ale ADN care apoi împiedică utilizarea catenei-matriță pentru sinteza ARNm. Un efect similar a fost observat, de asemenea, prin utilizarea oligodezoxinucleotidelor care recunosc șanțul mare al ADN dublu-catenar prin formarea unui helix triplu.

BIOSINTEZA PROTEINELOR: TRADUCEREA

PRINCIPII GENERALE

Necesitățile dezvoltării

Corpul necesită o creștere netă a cantității de proteină pentru asigurarea dezvoltării, înlocuirea celulelor moarte (de exemplu celulele de tip „brush border" din intestin) și producerea de proteine în lapte pe perioada lactației. O asemenea creștere netă poate fi cauzată de mărirea vitezei de sinteză sau scăderea ratei de degradare. Un om adult poate sintetiza aproximativ 400 g de proteină pe zi.

Bilanț metabolic

Acum 60 de ani, când au fost administrați la șobolani aminoacizi marcați radioactiv, s-a constatat cu surpriză că majoritatea proteinelor din corp au fost în mod constant sintetizate și degradate la aminoacizi (vezi fig. 3.36) Acest fapt a dus la conceptul general de stare dinamică a constituenților din corp. S-a demonstrat ulterior că diferite proteine au fost reciclate cu diferite viteze și că viteza reciclării a depins de diferite condiții patologice. În termeni generali, „mașina" de sinteză proteică din organism operează în permanență la capacitate maximă, astfel încât dacă o anumită proteină trebuie sintetizată în cantitate mai mare, sinteza altora trebuie să fie redusă. Viteza de reciclare a unei proteine este exprimată de obicei prin timp de înjumătățire biologic. Cea mai stabilă proteină din corp este colagenul, care este și cel mai abundent. Chiar și în aceste condiții, în anumite țesuturi colagenul se reciclează mai rapid decât în altele. Despre proteinele din creier se crede a avea o viteză mică de reciclare, dar acum aceste date sunt discutabile.

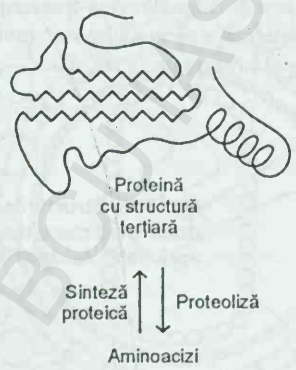


Fig. 3.36. Sinteza proteinelor din aminoacizi liberi.

Intermediari în sinteza proteică

Intrucât, așa cum am văzut în capitolele precedente, enzimele proteolitice pot degrada proteinele la polipeptide, pare posibil ca aceste polipeptide să devină substrat pentru sinteza proteinelor. Intr-adevăr, ținând cont de asemănările dintre domeniile diferitelor proteine, chiar și cele care având funcții diferite, trebuie luată în considerare posibilitatea ca structurile primare ale proteinelor să poată fi modificate prin schimbarea aminoacizilor în lanțurile polipeptidice existente. Acum este evident că scheletul polipeptidic al tuturor proteinelor este sintetizat din aminoacizi liberi.

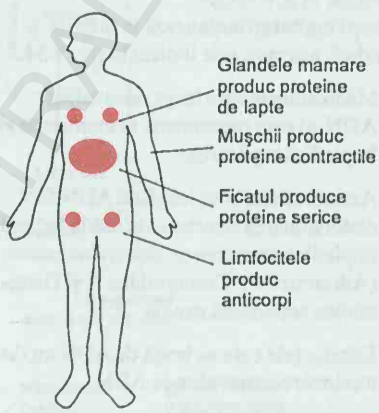


Fig.3.37. Diferite organe sintetizează diferite proteine prin exprimare diferențiată a ADN-ului lor comun.

Fig. 3.38. Aminoacizii (aa) sunt asamblați temporar pe o matriță, într-o ordine care începe de la capătul N-terminal al polipeptidului.

Specializare între organe

În timp ce, așa cum s-a văzut, ADN-ul în toate celulele corpului are capacitatea de a oferi informația genetică pentru sinteza tuturor proteinelor din corp, diferitele țesuturi și organe sunt specializate pentru sinteza anumitor proteine (fig. 3.37). Astfel, anumite celule, numai în mod virtual sintetizează o singura proteină, cum ar fi sinteza hemoglobinei în reticulocite. Alte celule sintetizează o gama largă de proteine, de exemplu hepatocitele sintetizează toate proteinele serice cu excepția γ-globulinelor. Aceasta înseamnă ca trebuie să existe modalități pentru controlul sintezei diferențiate a proteinelor. Că astfel de controale sunt potențial reversibile este demonstrat prin faptul că ADN preluat de la celule adulte (adică diferențiate) poate fi utilizat pentru generarea unui embrion, așa-numitul experiment de clonare la oaie. Uneori tumorile posedă capacitatea de a sintetiza proteine, altele decât cele sintetizate în celula de origine (de exemplu, sinteza α-fetoproteinei tipice pentru embrioni, de către celule hepatoma); acest fenomen este cunoscut ca sinteză proteică ectopică.

ASAMBLAREA AMINOACIZILOR PE O MATRIȚĂ

Dovezi pentru susținerea ipotezei matriței

Înainte de a se cunoaște metoda prin care se sintetizează proteinele *in vivo*, a fost postulat că aminoacizii ar fi asamblați în proteine sub acțiunea unor enzime specifice. Deși ulterior a fost confirmat acest lucru în cazul sintezei multor peptide biologic active derivate din microorganisme, nu s-a validat în cazul sintezei de proteine. În microorganisme, sistemele biosintetice care catalizează formarea peptidelor biologic active, în special al celor cu activitate antibacteriană, constă în interacțiunea mai multor enzime care sunt adesea foarte mari (cu valori M_r până la 1 700 000). Genele corespunzătoare acestor module repetitive codifică fiecare incorporarea unui singur rest de aminoacid. ATP este utilizat ca sursă energetică. Având în vedere mărimea lor, sinteza enzimatică a proteinelor ar cere o gamă uriașă de enzime specifice. Conceptul de asamblare a aminoacizilor pe o matriță a fost conceput chiar înainte de a se cunoaște natura matriței. A fost arătat apoi că această matriță este ARN. Studii asupra sintezei hemoglobinei au arătat că aminoacizii participanți sunt asamblați începând cu capătul amino, așa cum se prezintă în fig. 3.38.

Tabelul 3.4. Lista şi prescurtările celor 20 de aminoacizi care participă la formarea polipeptidelor (notare cu trei litere şi cu o literă)

Glicona (Gly, G)	Prolina (Pro, P)	Asparagina (Asp, N)
Valina (Val, V)	Triptofan (Trp, W)	Lizina (Lys, K)
Alanina (Ala, A)	Tirozina (Tyr, Y)	Arginina (Arg, R)
Leucina (Leu, L)	Fenilalanina (Phe, F)	Histidina (His, H)
Izoleucina (Ile, I)	Acid glutamic (Glu, E)	Metionina (Met, M)
Serina (Ser, S)	Glutamina (Gln, Q)	Cisteina (Cys, C)
Treonina (Thr, T)	Acid aspartic (Asp, D)	

Tipul aminoacizilor participanţi

Deşi proteinele conţin o gamă largă de aminoacizi diferiţi, numai 20 de aminoacizi participă la asamblare pe matriţă. Aceştia sunt enumeraţi în tabelul 3.4. Unele resturi de aminoacizi sunt apoi modificate după incorporare în lanţurile polipeptidice. Acest proces este cunoscut sub numele de modificare post-traducere. Printre aminoacizii incorporaţi sunt glutamina şi asparagina, dar alţi aminoacizi care se găsesc de obicei in proteine, cum ar fi hidroxiprolina şi hidroxilizina, fosfoserina, fosfotreonina şi fosfotirozina, nu sunt incluşi. În asemenea cazuri, aminoacizii iniţiali suferă reacţii de hidroxilare sau fosforilare după incorporarea lor în lanţul polipeptidic. Cistina se formează din două resturi de cisteină.

Realizarea unei structuri terţiare cu activitate biologică optimă

În timp ce, aşa cum s-a arătat în Capitolul 2, structura terţiară a unei proteine depinde fundamental de structura primară, s-a constatat că în anumite cazuri acest lucru nu este suficient. Moleculele „chaperon" (p. 16) pot influenţa structurile terţiare şi, în cazul prionilor (p. 16), formarea unui dimer poate schimba profund structura terţiară a monomerilor. În ciuda acestor rezerve, această secţiune privind structura proteinelor se va ocupa în principal cu biosinteza polipeptidelor cu o structură primară corectă.

Sinteza proteinelor multicatenare

Aşa cum s-a văzut, anumite proteine conţin câteva catene polipeptidice diferite. Asocierea acestor catene se poate face prin legături slabe necovalente, aşa cum este cazul hemoglobinei (vezi fig. 3.39), în care situaţie catenele se asociază spontan, şi deci nu este necesar un nou mecanism. În alte cazuri, asocierea poate fi stimulată de prezenţa unei alte proteine, cunoscută sub denumirea de moleculă „chaperone". Un exemplu relevant este cel al imunoglobulinelor unde proteina ce leagă imunoglobuline („Ig-binding protein"), prezentă în reticulul endoplasmic rugos al plasmocitelor, asistă combinarea lanţurilor grele şi uşoare ale imunoglobulinelor. Proteinele care sunt destinate a fi exportate din celulă sunt de obicei sintetizate în formă de precursor conţinând un peptid adiţional la capătul N-terminal. Asemenea proteine (de exemplu albumina serică) sunt cunoscute ca proproteine şi peptida ca propeptidă. Propeptida este eliminată de către o enzimă numită furină, membru al familiei de proteaze PC, în timpul trecerii proteinei prin aparatul Golgi pentru a forma proteina matură. Multe propeptide, inclusiv cele implicate în cascada de coagulare sanguină şi numeroase proteine virale, sunt legate de proteinele mature prin doi aminoacizi bazici adiacenţi (vezi, de exemplu, proopiomelanocortina, p. 32). Sinteza insulinei necesită o discuţie separată.

Biosinteza insulinei

Insulina este în strânsă legătură structurală cu relaxina şi factorii de creştere 1 şi 2 de tip „insulin-like" (somatomedinele) care sunt sintetizate în ficat şi anumite ţesuturi ţintă sub controlul hormonului de creştere (somatotropina), secretat de lobul anterior al hipofizei. Insulina este formată din două catene, arătate În fig. 3.40 în roşu. Este sintetizată ca precursor, proinsulina, în care cele două catene sunt legate printr-un peptid de conectare, resturi de aminoacizi 31-63. Proinsulina, care are numai 5% din activitatea biologică a insulinei se conver-

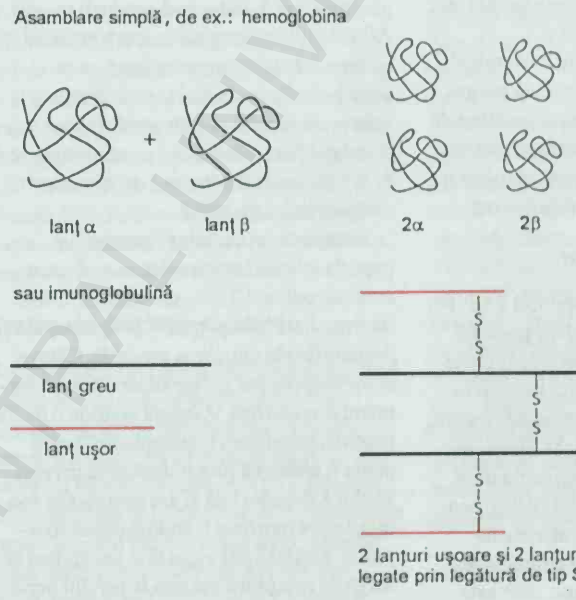


Fig. 3.39. Sinteza proteinelor multicatenare. Lanţurile separate se asociază de obicei spontan.

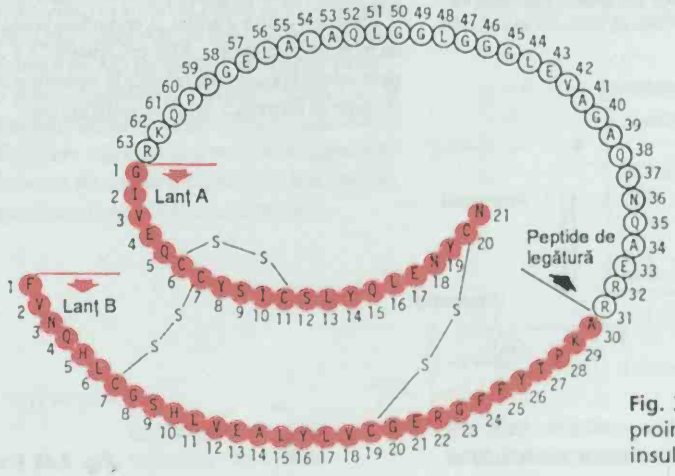


Fig. 3.40. Conversia proinsulinei de porc la insulină.

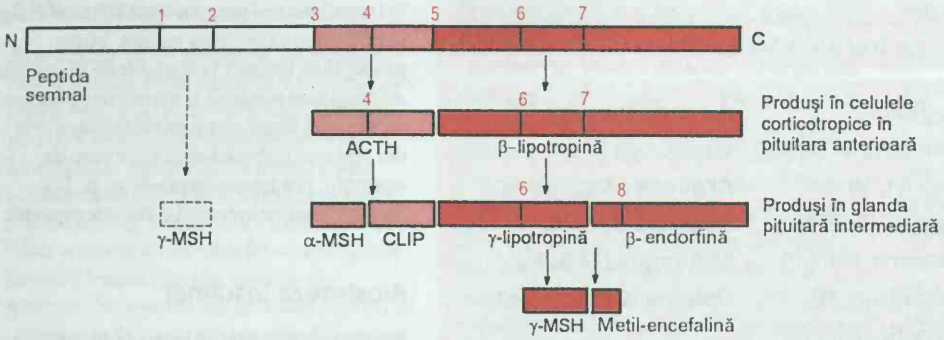


Fig. 3.41. Hormonii peptidici rezultă în general prin fragmentarea unui precursor proteic mai mare. Ruperea preproopiomelanocortinei.

teşte la insulină în aparatul Golgi. În timpul conversiei, proteazele PC2 şi PC3 scindează la capătul carboxil a unei perechi de aminoacizi KR (62 şi 63) şi RR (31 şi 32). O carboxipeptidază, protează de tip „B-like" (carbopeptidaza H) acţionează apoi pentru eliminarea RR formând insulina. Peptida de conectare fără capătul RR este cunoscut ca peptid C. Deşi acest peptid nu are acţiune „insulin-like", sunt multe date recente care arată ca acesta are şi alte funcţii. Proinsulina, ca majoritatea proteinelor secretoare aşa cum se va explica (p. 42) este sintetizată ca precursor având o extrapeptidă-semnal la capătul N-terminal, molecula completă fiind cunoscută ca preproinsulină. De altfel, propeptida adiţională este eliminată înainte ca sinteza proinsulinei să fie terminată, astfel preproinsulina nu există în sine, integră, în condiţii *in vivo*.

Sinteza poliproteinelor

Aşa cum s-a menţionat în capitolul 2 (p. 16) în cazul unor hormoni peptidici, peptidul activ este obţinut prin scindarea unei proteine mari. Când din precursorul proteic se formează mai mult decât o proteină matură, el este denumit poliproteină. Modelul de rupere a unei anume poliproteine poate fi diferit în funcţie de ţesut; astfel acelaşi produs genic poate genera seturi diferite de hormoni polipeptidici. Un exemplu îl reprezintă proopiomelanocortina, care este precursor al hormonului adrenocorticotrop (ACTH) sau ale altor hormoni, aşa cum se arată în figura 3.41. Produsul iniţial al traducerii în hipofiză conţine o peptidă semnal la capătul N-terminal, care este eliminată, rezultând propiomelanocortina cu $M_r = 31.000$. Barele verticale întunecate reprezintă situri de scindare proteolitică pentru enzime specifice, care includ o familie de proteaze numite Kex 2, PC2 şi PC3.

Siturile de scindare sunt Arg-Lys, Lys-Arg sau Lys-Lys. În celulele corticotrope ale lobului anterior al hipofizei, sunt prezente enzime care scindează în poziţiile 3 şi 5, eliberând produşii majori ACTH şi β-lipotropina ce intră în circulaţia generală. În lobul intermediar („pars intermedia"), în special la vertebrate inferioare omului, aceşti produşi sunt scindaţi ulterior la nivelul siturilor majore 4, 6, şi 7 eliberând hormonul de stimulare a melanocitelor (α-MSH „melanocyte-stimulating hormon") şi peptida lobului intermediar, asemănător corticotropinei CLIP („corticotropin-like intermediate lobe peptid"), γ-lipotropina şi β-endorfina în circulaţia generală. Câteva β-lipotropine pot fi degradate ulterior, formând β-endorfină. Aceasta conţine o pentapeptidă, encefalina („enkephalin") care poate fi eliberată prin hidroliză la nivelul sitului 8 β-endorfină şi are proprietăţi asemănătoare morfinei („endogeneous morphine") astfel încât aceasta şi encefalina se leagă de receptorii opiacei în ţesutul nervos. S-a crezut în mod eronat, că β-lipotropina mobilizează acizii graşi din ţesutul adipos.

Deşi, aşa cum s-a arătat, β-endorfina poate da naştere encefalinei („Met-enkephalin"), s-a demonstrat apoi că encefalinele în suprarenale şi creier se formează din proencefaline care conţin copii multiple (adesea 6) ale encefalinelor situate în sistem „sandwich" între perechi de aminoacizi bazici.

Etape în sinteza proteinelor din aminoacizi liberi

Activarea aminoacizilor

Prima etapă în sinteza proteinelor implică activarea aminoacizilor. Întrucât polipeptidele sunt substanţe polimere, formarea lor necesită energie, deci aminoacizii trebuie activaţi. S-a demonstrat că activarea are loc la gruparea carboxil printr-o reacţie ce implică ATP, rezultând un aminoacil-adenilat şi pirofosfat, aşa cum este prezentat în figura 3.42. Există câte o enzimă specifică pentru activarea fiecăruia din cei 20 de aminoacizi diferiţi.

Legarea aminoacidului la ARNt

A doua etapă implică transferul aminoacidului activat la ARN de transfer (ARNt) (vezi figura 3.43). În acest transfer sunt implicate aceleaşi enzime ca şi cele din etapa 1. Există cel puţin un ARNt specific pentru fiecare din cei 20 de aminoacizi, dar toţi au aceleaşi trei nucleotide la capătul 3' şi anume CCA, la care se ataşează restul de aminoacid.

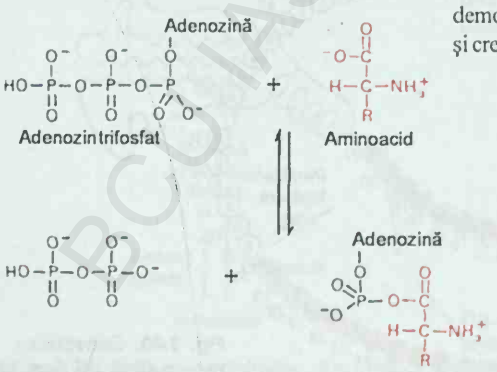


Fig. 3.42. Etapa 1. Activarea aminoacizilor.

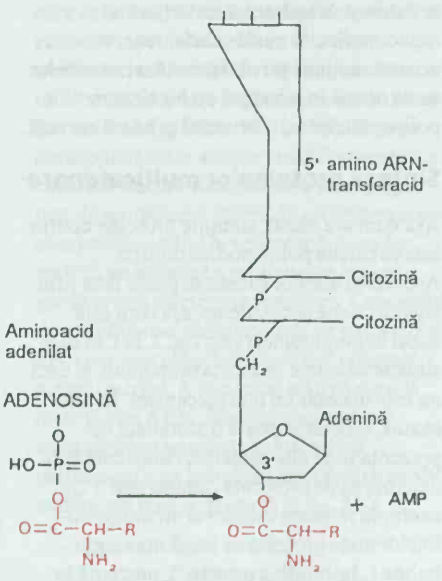


Fig. 3.43 Etapa 2. Transferul aminoacidului activat la ARNt.

Prima bază a codonului:	Baza a 2-a a codonului: U		C		A		G		A 3-a bază a codonului
U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys	U
	UUC		UCC		UAC		UGC		C
	UUA	Leu	UCA		UAA	Term*	UGA	Term*	A
	UUG		UCG		UAG		UGG	Trp	G
C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg	U
	CUC		CCC		CAC		CGC		C
	CUA		CCA		CAA	Gln	CGA		A
	CUG		CCG		CAG		CGG		G
A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser	U
	AUC		ACC		AAC		AGC		C
	AUA		ACA		AAA	Lys	AGA	Arg	A
	AUG	Met+Init.†	ACG		AAG		AGG		G
G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly	U
	GUC		GCC		GAC		GGC		C
	GUA		GCA		GAA	Glu	GGA		A
	GUG	Val+Init.†	GCG		GAG		GGG		G

Fig. 3.44. Codul genetic. Init şi Term indică iniţiere şi respectiv terminare.

Ataşarea se face prin legătură esterică ce facilitează utilizarea ulterioară a aminoacidului la formarea legăturii peptidice.

CODUL GENETIC

Rolul celor 64 codoni

Consideraţii teoretice au condus la previziunea faptului că pentru traducerea secvenţei formate de 4 nucleotide diferite din ARNm într-o aliniere ordonată a celor 20 de aminoacizi în polipeptide ar fi necesar cel puţin un triplet de baze, numit codon. Această previziune a fost ulterior adeverită prin experimente genetice cu mutaţii punctiforme („missense"). Codul prezentat în figura 3.44 are 61 triplete codificând pentru aminoacizi. Trei triplete indică terminarea (marcate Term*) unui lanţ polipeptidic (aşa numiţii codoni non-sens, întrucât ei nu codifică aminoacizi). Două alte triplete sunt utilizate pentru iniţierea (marcate Init*), precum şi pentru Met şi Val, respectiv, deşi tripletul pentru Val este utilizat rar în acest scop. Codul genetic este considerat universal, fiind valabil pentru toate organismele vii, eucariote sau procariote. Codul pentru mitocondrii diferă în unele privinţe. Astfel la om, UGA este folosit pentru Trp mai degrabă decât Term, AUA pentru Met mai degrabă decât Ile şi AGA pentru Term mai degrabă decât Arg.

Codul genetic *in vivo*

Codul genetic a fost determinat în principal folosind sisteme acelulare. Existenţa sa se poate verifica în două moduri. În primul rând se poate testa dacă el este responsabil pentru schimbări punctuale ale unui aminoacid (mutaţii missense) într-o proteină (aşa cum se întâmplă cu hemoglobina în anemia falciformă) pe baza faptului că este o mutaţie punctiformă. Aşa cum se vede în figura 3.45, acest fapt s-a demonstrat. Schimbarea de la acid glutamic la valină în poziţia 6 a lanţului β apare ca rezultat al schimbării lui A cu U în oricare din cei doi codoni corespunzători acidului glutamic. În al doilea rând, se poate testa dacă structura cunoscută a ARNm corespunde cu structura polipeptidului corespunzător. Polipeptidul şi ARNm sunt coliniari, ARNm fiind citit în direcţia 5' → 3'. Din aceste consideraţii se poate concluziona că codul genetic este caracteristic şi esenţial celulei vii.

	HbA	HbS
	Glu	Val
Codoni posibili	GAA	GUA
	GAG	GUG

Fig. 3.45. ARNm caracteristic pentru hemoglobina celulelor seceră („sickle-cell").

Cadre de iniţiere şi citire

Recunoaşterea codonului iniţiator determină cadrul de citire, de exemplu care baze azotate vor forma tripleţi pentru codonii succesivi. Aşa cum se arată în figura 3.46, secvenţa bazelor începe cu AUG. Întrucât AUG codifică şi metionina, toate proteinele încep cu restul acestui aminoacid, dar sunt mulţi codoni AUG într-un ARNm. De aceea, trebuie să fie căi speciale pentru a desemna codonul AUG care semnifică iniţiere. ARNm arătat în figura 3.46 se termină cu UAG - unul din cei trei codoni care sunt folosiţi pentru terminare. În ARNm pentru o proteină oarecare, mai mulţi codoni pot fi folosiţi pentru un anumit aminoacid, cum ar fi glicina, aşa cum este indicat în figura 3.44. În acest fel, există o degenerare în a codului genetic într-un ARNm oarecare dat.

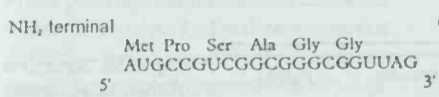


Fig. 3.46. Utilizarea codonilor în ARNm.

STRUCTURA ARN-transfer

Structura secundară şi localizarea anticodonilor

Iniţial s-au făcut multe speculaţii privind modul în care un anumit aminoacid se aseamănă cu codonul său în ARNm. Crick a prezis că această asociere ar fi posibilă prin intermediul unui ARN adaptor scurt care ar purta anticodonul. Descoperirea ARNtransfer (ARNt, iniţial denumit ARN solubil pentru că nu era asociat cu nici o particulă în omogenate celulare - celule dezintegrate -) a confirmat ipoteza şi s-a demonstrat ulterior că ARNt ce poartă un aminoacid are unica proprietate de a se localiza la codonul corect.
Structura anticodonului, indicată prin CGG (3' → 5') în figura 3.47 poate fi prezisă, cu unele excepţii aşa cum va fi explicat mai departe, pe baza împerecherii bazelor azotate (A-U, G-C).

Structura ARNt alanină

O caracteristică comună a ARNt este că el conţine multe perechi de baze intramoleculare şi baze modificate (de exemplu metilguanozină, MeG). Semnificaţia acestor baze modificate nu se ştie exact.

Pornind de la structura primară a ARNt pentru alanină, Holley a studiat modul în care poate fi format numărul maxim de perechi de baze intramoleculare. Figura 3.48 arată că toate bazele, cu excepţia celor arătate în buclă pot fi împerecheate, formând o structură în formă de frunză de trifoi. Structura primară a celorlalţi ARNt studiaţi, confirmă frunza de trifoi, la fel ca puţinele structuri terţiare determinate prin cristalografie cu raze X. După aşteptări, un triplet de baze neîmperecheate este prezent şi poate servi ca anticodon. Ele sunt în bucla anticodon. I este inozină (adenozina A denaturată) şi se împerechează similar lui A.

Ipoteza „wobble"

Din codul genetic, se aşteaptă să fie 61 ARNts diferiţi (unul pentru fiecare codon sens), dar nu sunt probabil mai mult de 40

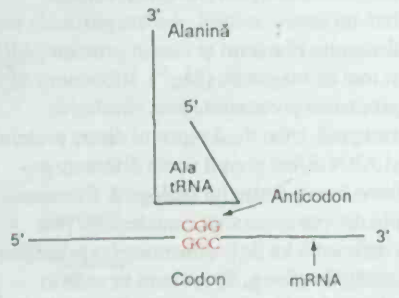


Fig. 3.47. Cuplarea anticodonului ARNt la codonul complementar din ARNm.

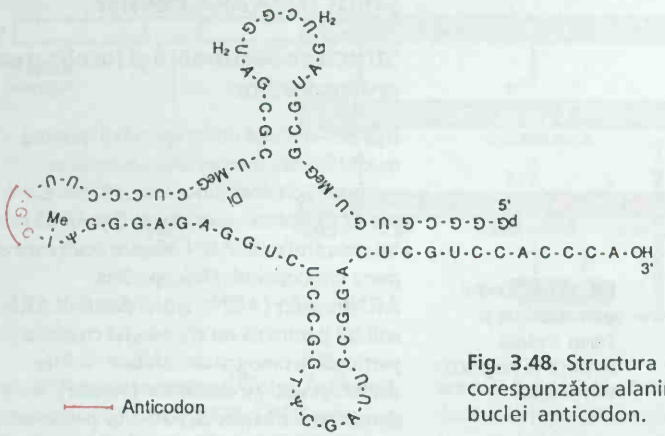


Fig. 3.48. Structura secundară a ARNt corespunzător alaninei cu evidenţierea buclei anticodon.

Tabelul 3.5. Coeficienţii de sedimentare (în unităţi Svedberg, S) ale ribozomilor şi ale subunităţilor lor

	Ribozomi intacţi	Subunităţi mari	Subunităţi mici
Procariote	70S	50S	30S
Eucariote	80S	60S	40S

5'Codoni	3'	GCU	GCC	GCA	GCG
3'Anticodoni	5'	CGI	CGI	CGI	CGC

Fig.3.49. Imperecherea celor doi ARNt pentru alanină cu cei patru codoni corespunzători alaninei.

ARNts diferiţi, întrucât un anticodon se poate împerechea cu mai multe tipuri de codoni. Crick a prezis că întrucât pentru primele două baze din codon ar exista împerecheri G-C, A-U, împerecherea la a 3-a bază ar putea fi imprecisă. Aceasta a fost denumită ipoteza „wobble" pentru care există în prezent o susţinere amplă. Astfel, în a treia poziţie, I se poate împerechea cu U, C sau A (figura 3.49) şi explică de ce există numai 2 molecule de ARNt pentru alanina care are 4 codoni.

ROLUL RIBOZOMULUI

Structura ribozomului

Biosinteza polipeptidelor implică participarea particulelor, deci nu este efectuată într-un sistem solubil. Aceste particule sunt denumite ribozomi şi conţin proteine, ARN şi ioni de magneziu (Mg^{2+}). Ribozomii de la procariote şi eucariote sunt similari în structură, chiar dacă raportul dintre proteină şi ARN diferă şi sunt unele diferenţe minime în activitatea lor biologică. Ribozomii din diferite surse sunt caracterizaţi prin coeficienţii lor de sedimentare (exprimaţi în unităţi Svedberg, S) aşa cum se vede în tabelul 3.5. Un ribozom este format din 2 subunităţi, una având o mărime dublă faţă de cealaltă, de aici numele de subunitate mare şi mică. Subunităţile sunt caracterizate prin valorile lor S: cele de la procariote sunt denumite 50S (mari) şi 30S (mici), iar cele de la eucariote 60S şi respectiv 40S. Ribozomii mitocondriilor sunt mai mici (uneori sunt denumiţi mitoribozomi, pentru a-i diferenţia de citoribozomi) şi seamnă cu ribozomii procariotelor. Mitoribozomii au mărimi diferite, în funcţie de provenienţa lor.

Caracteristicile ARN ribozomal

Mărimea ARN în diferite subunităţi ribozomale (ARNr) diferă, de asemenea numărul diferitelor molecule de tip ARNr. Conform tabelului 3.6, subunitatea 50S din procariote conţine două tipuri de ARN, 23S şi 5S, în timp ce subunitatea 30S conţine numai un tip de ARN, 16S. O situaţie asemănătoare se găseşte la eucariote, cu excepţia faptului că subunitatea 60S conţine trei tipuri de ARN.

Tabelul 3.6. Caracteristici ale ARN în subunităţile ribozomale

Subunitate ribozomală	S ale ARN	M_r
50S	23S	0,98 x 10^6
	5S	40.000
30S	16S	0,9 x 10^6
60S	28S	1,7 x 10^6
	5,8S	51.000
	5S	39.000
40S	18S	0,7 x 10^6

M_r - masă moleculară relativă; S – unit. Svedberg

ARN mesager şi structura sa

ARNr nu este matriţa pe care aminoacizii se asamblează. Matriţa este reprezentată de un alt tip de ARN, ARN mesager (ARNm) care devine asociat cu ribozomii pentru a forma poliribozomii. Figura 3.50 arată caracteristicile structurale ale unui ARNm tipic. La capătul 5' (amonte) există o regiune care nu codifică aminoacizi (regiunea 5' necodificatoare). În bacterii s-a dovedit că secvenţa de baze a acestei regiuni este complementară cu capătul 3' al ARN 16S şi prin urmare s-a postulat că regiunea aceasta are rol în asocierea ARNm cu subunitatea ribozomală 30S (această secvenţă este denumită uneori Shine-Dalgarno după numele celor care au identificat-o). În multe molecule de ARNm la eucariote există un „cap" la capătul 5' format din 7-metilguanozină, ataşată printr-o „punte" trifosfat. Capătul 3' posedă de obicei o coadă de A, coadă poli(A), care nu codifică aminoacizi.

Editarea ARNm

Una sau mai multe baze în ARNm pot fi modificate *in vivo*, proces cunoscut ca „editare" ARN. Majoritatea cazurilor se referă la mitocondrie, dar în ARNm al apolipoproteinei B-100 (p.153), citozina este deaminată la uridină. Astfel, codonul pentru glutamină (CAA)(figura 3.44) devine un codon stop (UAA) şi rezultă o proteină scurtată (apo-B-48). Citidindeaminaza specifică implicată nu este dependentă de energie sau cofactori.

Elongarea lanţului

Elongarea lanţului implică o mişcare de suveică („shuttle") a ARMt între două poziţii de pe ribozom, marcate ca situsuri P (peptidil) şi A (aminoacil) în figura 3.51. Aminoacil-ARNt intră normal în situsul A, în timp ce peptida ataşată la ARNt se localizează în situsul P. Când cei doi ARNt sunt asamblaţi în ribozom, o legătură peptidică se formează printr-un atac nucleofilic al grupării α-amino a aminoacidului ataşat la ARNt din situsul A, asupra grupării carboxil a lanţului ataşat la situsul P (semnificaţia lui fMet va fi explicată mai jos). ARNt este apoi eliberat din situsul P al ribozomului. Formarea noii legături peptidice este catalizată de peptidiltransferază.

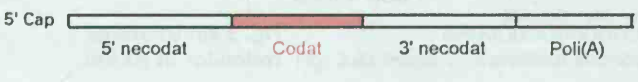


Fig. 3.50. Structura ARNm la eucariote.

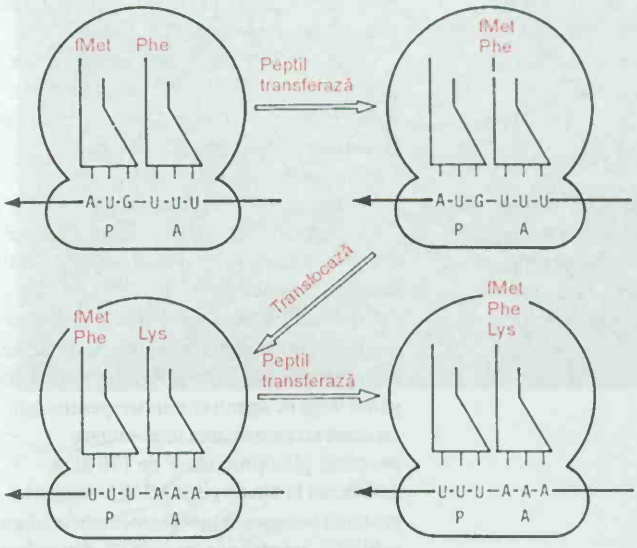


Fig. 3.51. Ribozomul şi elongarea lanţului.

Molecula de ARNt ce poartă recent extinsa peptidă se mută din situsul A în P (proces numit translocare). Enzima ce catalizează acest proces este o translocază.

Iniţierea lanţului

Aşa cum s-a explicat, aminoacil-ARNt intră în situsul A, deci misiunea iniţierii lanţului este de a asigura ca aminoacil-ARNt ce transportă restul aminoacid N-terminal să intre în situsul P. La eucariote, metionina (Met) şi la procariote formylmetionina (fMet) servesc ca resturi aminoacid N-terminale ale polipeptidelor nou iniţiate. Sunt 2 molecule ARNt diferite pentru Met, deşi este codificată de un codon. ARNt care poate intra în situsul P se numeşte ARNt iniţiator. O moleculă de metionină (Met) legată la acest ARNt poate fi formilată în prezenţa unei enzime, aşa cum se întâmplă întotdeauna la procariote şi este denumit $ARNtf_{Met}$.

Mecanismul de iniţiere a lanţului este similar în ambele tipuri de celule, dar eucariotele nu au enzime formilante, astfel încât restul de aminoacid N-terminal este Met şi nu fMet. În mitocondrii, enzima formilantă este prezentă astfel încât iniţierea lanţului seamănă cu cea de la procariote. La procariote, gruparea formil este eliminată aşa cum este şi Met, dacă nu trebuie să fie în poziţia N-terminală a proteinei mature. La eucariote, Met este în mod similar eliminată în anumite cazuri, după ce ~ 30 aminoacizi au fost asamblaţi (adăugaţi lanţului polipeptidic).

Factori de iniţiere la eucariote

Multe proteine funcţionează ca factori de iniţiere, care asigură o localizare corectă a $ARNtf_{Met}$-Met în situsul P al ribozomului. Aceşti factori sunt desemnaţi ca eIF. Aşa cum se vede în figura 3.52, aceşti factori se asociază cu ARNm şi apoi cu subunitatea mică ribozomală (40S) şi GTP pentru a da un complex în care codonul AUG este corect aliniat. La acest complex se ataşează subunitatea mare ribozomală (60S) cu eliberare de GDP, pentru a da complexul de iniţiere ribozomal (80S). La procariote, procesul este în principiu similar, dar cu mai puţini factori de iniţiere (IF).

Terminarea lanţului

Când codonul UAA sau unul din ceilalţi codoni non-sens (UAG, UGA) din ARNm ocupă situsul A din ribozom, o proteină cunoscută ca factor de eliberare, se leagă la situsul A în prezenţa GTP şi catalizează reacţia de terminare. Reacţia implică hidroliza legăturii esterice peptidil-ARNt, hidroliza GTP şi eliberarea lanţului polipeptidic complet a ARNt deaminoacilat şi a ribozomului de pe ARNm. La procariote, sunt trei factori de eliberare din care doi cu specificitate de codon, în timp ce la eucariote sunt numai doi. După eliberarea lanţului polipeptidic, ribozomul se disociază în cele două subunităţi, pregătite pentru o nouă sinteză proteică. Un factor de reciclare ribozomală a fost identificat la procariote. Secvenţa etapelor din acest ciclu este prezentată în figura 3.53.

ACŢIUNEA ANTIBIOTICELOR

Principii generale

În timp ce mecanismul general al sintezei proteice la procariote şi eucariote este în esenţă similar, există anumite diferenţe cum

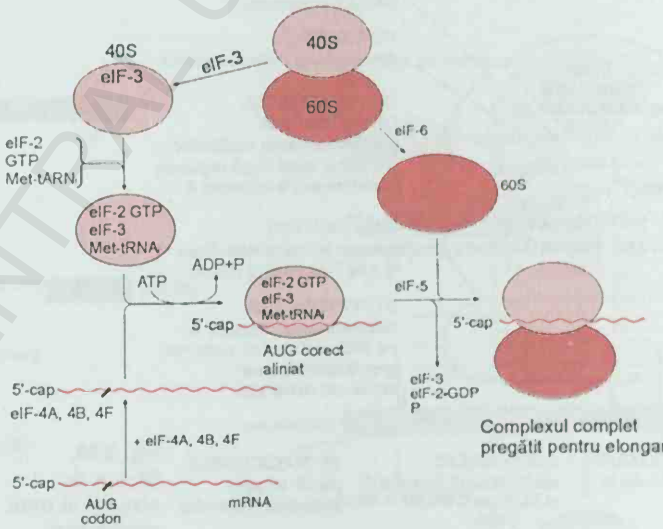


Fig. 3.52. Factori implicaţi în iniţierea lanţului.

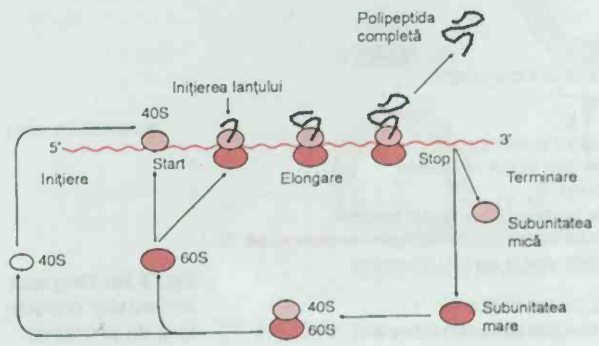


Fig. 3.53. Ciclul ribozomal şi terminarea lanţului.

ar fi formilarea aminoacizilor în etapa de inițiere (menționată mai sus). Asemenea diferențe explică acțiunea țintită a unor antibiotice, care a fost exploatată de industria farmaceutică pentru producerea de medicamente utile. Penicilina nu intră în această categorie pentru că rolul său este de a inhiba o etapă esențială în sinteza peretelui celular peptidic din bacterii susceptibile; aceasta nu inhibă sinteza proteică. Trebuie reamintit că bacteriile sunt procariote, celulele animale sunt eucariote, iar fungii (de exemplu *Candida albicans*, o ciupercă patogenă) sunt eucariote. Prin urmare, este greu de găsit un antibiotic care este eficient împotriva creșterii fungilor și care să nu fie concomitent toxic pentru celulele umane.

Acțiunea antibioticelor specifice

Primul antibiotic utilizat experimental a fost puromicina, cu o structură care seamănă cu capătul 3' al ARNt cu un rest de aminoacid atașat. Puromicina induce prematur terminarea sintezei polipeptidice, dar întrucât este activă în toate tipurile de celule, nu este un antibiotic util în terapie.

Două exemple ale acțiunii antibioticelor, sunt prezentate în figura 3.54. Cloramfenicolul inhibă peptidiltransferaza la procariote și în mitocondrii. Aceasta determină toxicitatea cloramfenicolului la oameni și cauzează uneori anemia aplastică. Cicloheximida inhibă translocaza, dar este specifică eucariotelor și de aceea este utilă numai experimental.

Figura 3.55. arată locul de acțiune a antibioticelor utilizate frecvent pentru tratamentul infecțiilor bacteriene. Rezistența față de o gamă largă de agenți chimioterapeutici este asociată cu exprimarea unei singure proteine, glicoproteina-P de 170 kDa, codificată la om de gena *MDR1*. Această proteină pompează medicamentele in afara celulelor, printr-un proces ATP-dependent.

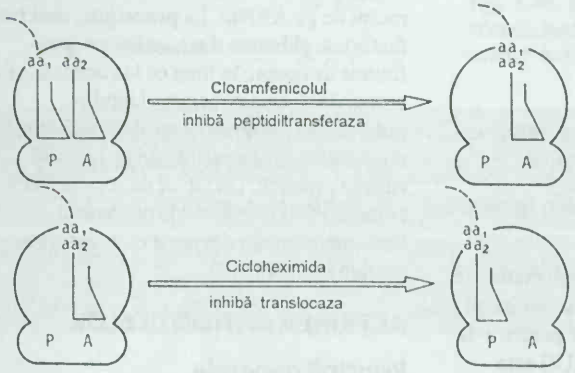


Fig. 3.54. Situsul de acțiune al cloramfenicolului și al cicloheximidei.

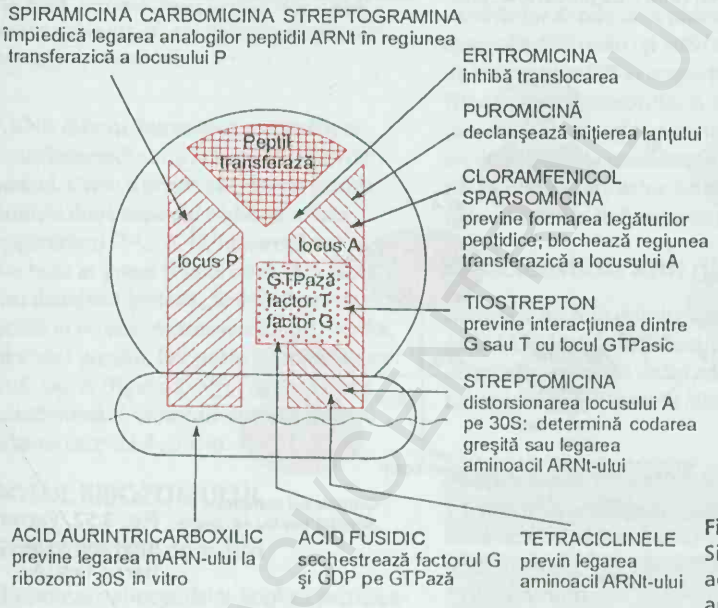


Fig. 3.55. Situsul de acțiune al unor antibiotice.

Originea variantelor moleculare de proteine

Variantele moleculare de proteine apar ca urmare a mutațiilor punctiforme. Exemple de structuri primare ale acestor variante moleculare sunt prezentate în figura 3.56. și sunt preluate de la numeroase hemoglobinopatii (vezi p. 57), albumină serică și insulină (p. 32). În cazul (2) apare o singură schimbare de aminoacizi (mutație cu sens greșit –„missense") așa cum s-a constatat la hemoglobina S din anemia falciformă. În cazul (3) este o mutație care generează un codon stop („nonsens") și astfel lanțul normal este scurtat; în concluzie un codon sens este convertit la un codon „nonsens" (stop). În cazul (4) un codon stop este convertit la un codon sens, astfel încât un lanț anormal de lung spre capătul C-terminal este sintetizat. În cazul (5) apare o mutație la capătul N-terminal care înseamnă că propeptida normal atașată prin doi aminoacizi bazici nu a fost eliminată. Acest fenomen are loc în anumite insulinopatii și în formarea proalbuminei Christchurch. Rezultatul este o extensie anormală a capătului N-terminal.

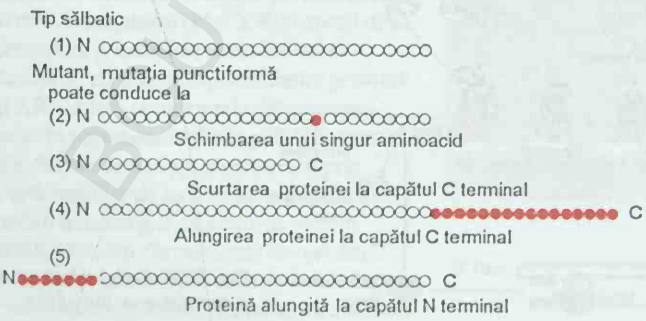
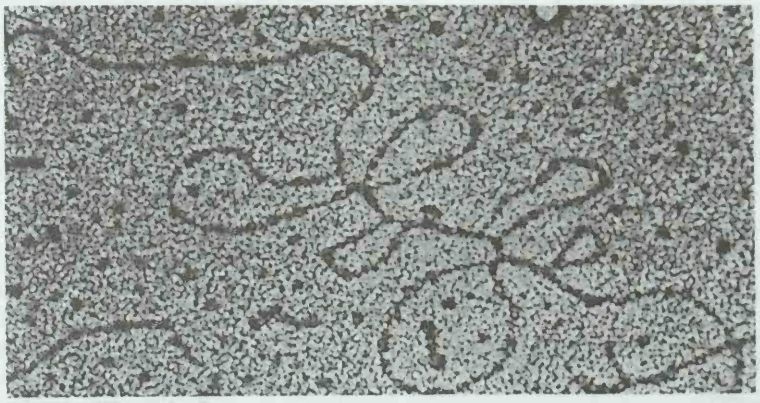


Fig. 3.56. Originea variantelor moleculare de proteine.

TRANSCRIPTUL PRIMAR AL GENEI

Metode de demonstrare a genelor discontinue

Când s-a comparat structura ARNm pentru ovomucoid cu lanțul ADN de pe care o fost transcris, ARNm a corespuns cu un mozaic de segmente separate de ADN. Acest lucru este ilustrat în figura 3.57, o imagine de microscopie electronică a ARNm hibridat cu genomul său și apoi vizualizat. ADN este marcat cu negru, iar ARNm cu roșu. Buclele de ADN sunt marcate cu litere și arată secțiunile de ADN care nu se hibridează,



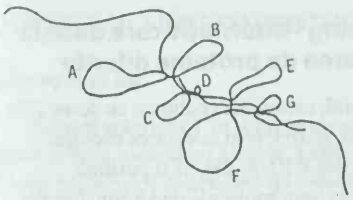


Fig. 3.57. Imagine electronică și vizualizarea liniară a unor secvențe de intervenție din gene.

secvențele fără cod și cele care se hibridează.

Introni și exoni

Transcrierea dă naștere unor molecule de pre-ARNm sau ARNm precursor (denumite și ARN heterogen sau Hn-ARN).

Figura 3.58 arată cum transcriptul primar de pre-ARNm al genei ovomucoid se modifică pentru a produce ARNm matur, care apoi este tradus într-o proteină.
În partea de sus a figurii este catena matriță a ADN cu buclele marcate ca și în figura 3.57. Zonele negre indică nucleotidele care vor fi traduse. Acestea sunt cunoscute ca exoni, iar secvențele intercalate ca introni. Intronii sunt excizați și exonii sunt „înnădiți" rezultând ARNm matur, care se traduce într-o proteină. Aproape toate genele eucariote conțin introni, în schimb nu s-au găsit introni la procariote.

Excizia intronilor și „înnădirea" exonilor

Faptul că intronii trebuie excizați din pre-ARNm este un fapt foarte important, la fel ca și „înnădirea" corectă a exonilor. Baza esențiala pentru acest proces sunt secvențele de consens ale bazelor azotate din introni. Câteva din acestea sunt prezentate în figura 3.59.

Astfel, la capătul 5' al intronilor este secvența AGGUAAGU, în timp ce la capătul 3' este o secvență neîntreruptă („stretch") de 10 pirimidine (U sau C) urmate de orice bază (N) și de C, sfârșind cu AG. Există, de asemenea, un situs între 20 și 50 nucleotide în amonte de situsul de tăiere 3' numit situs de ramificare.

Figura 3.60 arată cum excizia și înnădirea se efectuează și în mod deosebit cum situsul de ramificare este folosit pentru formarea unui lasou (laț). Procesul are loc prin două reacții de transesterificare. În primul rând se formează un grup 2', 5' fosfodiesteric, cu eliminarea concomitentă a exonului 5'. Apoi, gruparea 3'-hidroxil a exonului 5' formează o

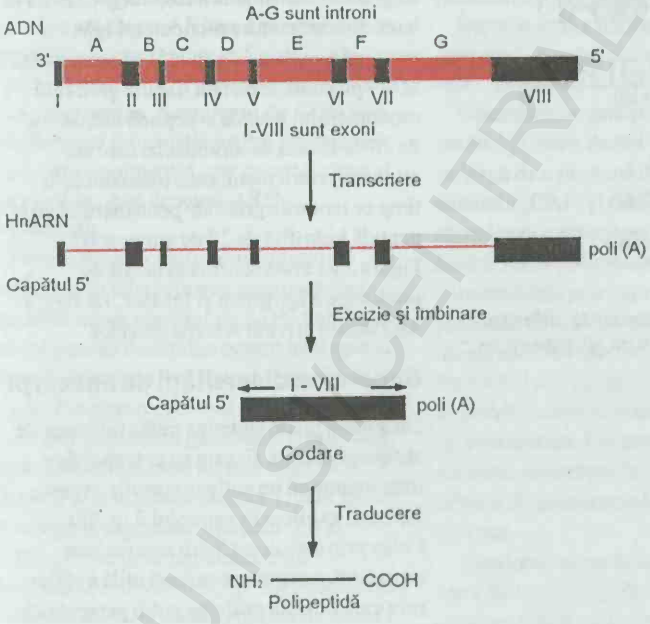


Fig. 3.58. Schema de maturare a pre-ARNm prin eliminarea intronilor și înnădirea exonilor.

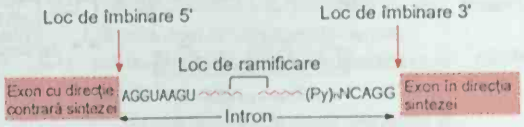


Fig. 3.59. Semnale de înnădire. Sunt arătate secvențele consens pentru situsurile de înnădire 3'și 5'.

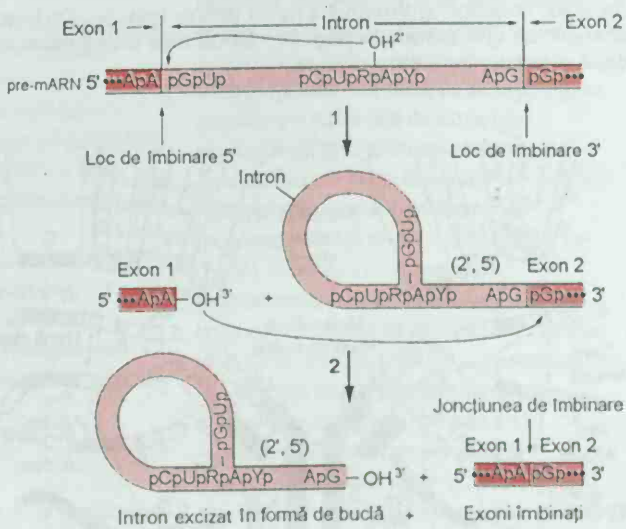


Fig. 3.60. Formarea unui „lariat" în înnădirea exonilor ARNm.

legătură fosfodiesterică cu capătul fosfat 5'-terminal al exonului 3', rezultând produsul înnădit. Intronul este eliberat în forma sa lasou şi este rapid degradat. Joncţiunile de înnădire sunt recunoscute şi cei doi exoni de unit sunt aduşi împreună prin intermediul unor molecule mici de ARN nuclear (snRNAs) care formează complexe proteice mici, numite ribonucleoproteine mici nucleare (snRNPs, pronunţate „snurps" în engleză). Complexul este cunoscut ca „spliceosome" o structură foarte mare de 50-60S. Anticorpii de la pacienţi cu lupus eritematos sistemic diseminat au avut un rol crucial în descoperirea snRNPs. În această boală autoimună, pacienţii au o gamă largă de anticorpi faţă de componentele nucleare. S-a demonstrat că anticorpii specifici anti-snRNPs blochează procesul de „splicing".

La protozoarul *Tetrahymena* eliminarea intronului nu necesită proteine. Un ARN este format din intronul excizat. Acest ARN este cunoscut ca ribozimă, care are atât activitate nucleazică, cât şi polimerazică.

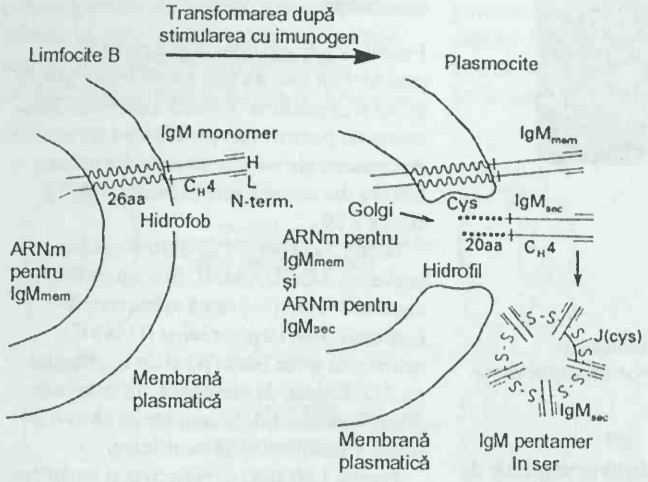


Fig. 3.61. Înnădire alternativă a ARNm care permite producerea a două molecule diferite de IgM.

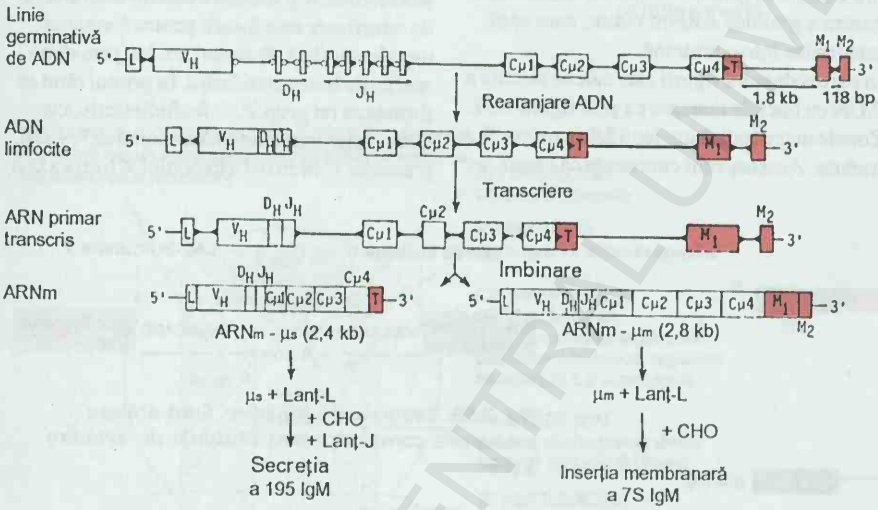


Fig. 3.62. Înnădire alternativă a genei pentru IgM. V_H, Cm1 etc. reprezintă diferite domenii ale IgM arătate în pag. 67. Blocul roşu indică exoni care sunt distribuiţi în două molecule de ARNm mature.

„Splicing" alternativ care duce la formarea de proteine diferite

În general, exonii sunt coliniari cu domeniile proteice. Astfel, prin selectarea exonilor într-un pre-ARNm dat, ar fi posibilă generarea unor molecule deARNm diferite, pornind de la aceeaşi secţiune a ADN genomic. „Splicing"-ul alternativ apare destul de des şi un exemplu este arătat în figura 3.61 şi 3.62, pentru generarea a două imunoglobuline (Ig) diferite. Limfocitul B poartă un monomer de IgM(p. 67) pe suprafaţa sa. Când un astfel de limfocit este recunoscut de un imunogen, acesta este stimulat să formeze o clonă de plasmocite care sintetizează şi secretă IgM pentamer. Regiunea C-terminală a lanţului greu H stă la baza diferenţei între monomerul IgM - o proteină membranară (p. 65), şi pentamerul IgM - proteină secretată. Lanţul greu H al monomerului posedă o peptidă hidrofobă de 26 de resturi de aminoacizi care are afinitate pentru membrana plasmatică, în timp ce lanţurile grele ale pentamerului au o peptidă hidrofilă de 20 de aminoacizi. Figura 3.61 arată schema generală de producere a IgMmem şi IgMsec, iar figura 3.62 detalii privind selecţia exonilor.

Generarea diversităţii de anticorpi

Un animal poate sintetiza multe milioane de anticorpi diferiţi, fiecare cu potenţial de interacţiune cu un antigen specific. Acest fapt este explicat în capitolul 5 (p. 68). Calea prin care acest lucru este realizat reprezintă o expunere sumară utilă a căilor prin care diferite proteine pot fi generate din genom. Există trei surse ale acestei diversităţi:

1. O diversitate de gene cu regiuni variabile
2. Recombinarea somatică: de exemplu fiecare din cele câteva sute de gene V pot să se lege de oricare din cele 5 gene J.
3. Mutaţie somatică (de exemplu în formarea lanţurilor uşoare).

Figura 3.62 arată calea de formare a anticorpilor. Genomul celulei stem conţine

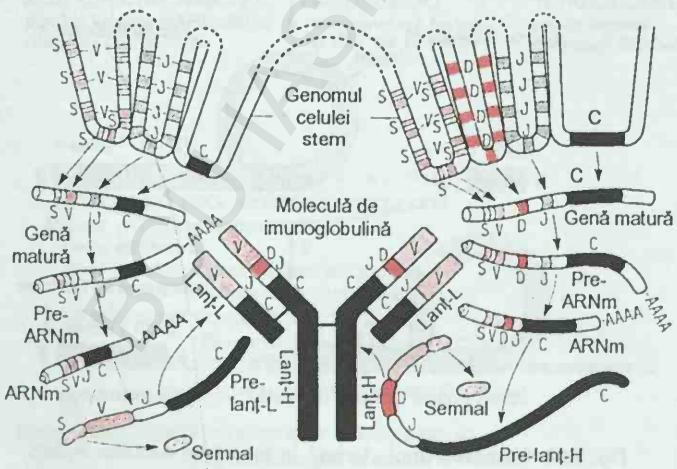


Fig. 3.63. Generarea diversităţii de anticorpi.

multiple variante ale genelor V şi J pentru lanţul uşor (L) şi ale genelor V, J şi D (diversitate) pentru lanţul greu (H). Genele V sunt precedate de un segment mic S ce codifică pentru o peptidă semnal (p.42). Când limfocitele se maturizează, fiecare celulă în diferenţiere îşi construieşte anumite gene L şi H cu o structură virtuală unică printr-un proces de recombinare care selectează întâmplător unul din setul de segmente de gene şi le asamblează împreună cu gena C. Pre ARNm este prelucrat pentru a da un ARNm matur care este tradus şi peptida semnal este eliminată. Se formează apoi prin oxidare punţile S-S.

CONTROLUL SINTEZEI PROTEICE

Operonul *lac*

S-a explicat anterior că, în timp ce toate celulele unui individ au acelaşi ADN, natura proteinelor sintetizate de celulele diferenţiate variază. Aceasta este valabil nu numai pentru celulele eucariote din organisme multicelulare dar, de asemenea, pentru bacterii atunci când au loc schimbări nutriţionale şi de mediu. Cea mai frecventă cale de sinteză proteică diferenţiată se face prin controlul transcrierii ADN pentru producerea de ARNm.

Prima demonstraţie a controlului transcrierii a fost făcută de Jacob şi Monod pentru operonul *lac*. Un operon este definit ca un grup de gene adiacente care se transcriu într-un singur ARNm. Caracteristicile esenţiale sunt prezentate în figura 3.64. Operonul controlează transcrierea ARNm pentru 3 proteine. Segmentul de ADN care conţine toată informaţia pentru producerea unui singur polipeptid este numit cistron şi operonul *lac* este denumit ARN policistronic.

Demonstrarea controlului sintezei proteice prin interacţiunea unei proteine specifice cu un segment de ADN stabileşte modul general de acţiune pentru înţelegerea controlului transcrierii în toate tipurile de celule. Proteina represoare este marcată ca R, de care inductorul galactozid (roşu) este legat. Dacă inductorul nu este legat de R, R adoptă o altă structură numită T, care poate să se lege la segmentul operator (O) al ADN. „*i*" este gena reglatoare care guvernează sinteza lui R; „p" este segmentul promotor al ADN şi este punctul de iniţiere a sintezei ARNm policistronic. G_1, G_2, G_3 sunt gene structurale ce guvernează sinteza celor 3 proteine ale sistemului marcate P_1, P_2, P_3; una din aceste proteine este β-galactozidaza celelalte sunt permeaza şi transacetilaza. ARNm policistronic conţine secvenţe Shine-Delgarno (p. 34) aşezate spre capătul 5' în amonte de fiecare secvenţă codificatoare a celor 3 proteine. Aceasta

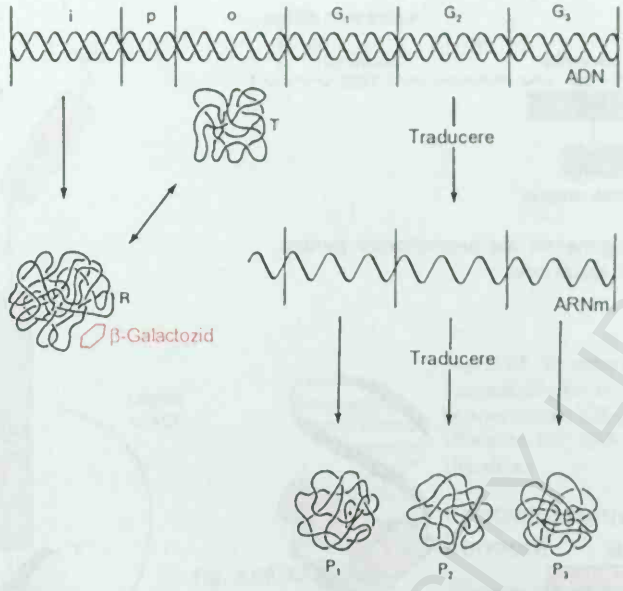


Fig. 3.64. Operonul *lac* şi controlul său de către un represor.

permite ribozomilor să se desprindă de ARNm şi să se relege pentru traducerea fiecărui ARNm.

În timp ce proteina represoare este legată de ADN, transcrierea nu poate avea loc pentru că situsul de iniţiere a transcrierii este în segmentul promotor. Acţiunea inductorului β-galactozid este de a determina ca represorul să se desprindă de ADN pentru a permite transcrierea şi apoi traducerea mesajului.

Întrucât starea normală este aceea în care operonul *lac* este inhibat, fenomenul descris este cunoscut ca şi „control negativ".

Operonul *lac* este şi subiectul unui control pozitiv. Astfel AMP ciclic (cAMP) se leagă de o proteină de activare a genei catabolit (CAP) şi complexul format stimulează transcrierea prin intensificarea legării ARN polimerazei la promotor. Circumstanţa prin care glucoza este sursa preferată de energie şi în prezenţa sa sunt numai cantităţi mici de β-galactozidază formată şi alte enzime catabolice, este explicată prin fenomenul de represie a catabolismului. Prezenţa glucozei determină scăderea concentraţiei de AMPc şi prin urmare dispare controlul pozitiv menţionat mai sus.

Deşi înţelegerea funcţionării operonului *lac* a fost o descoperire importantă, caracteristicile multor altor operoni în procariote cu caracteristici specifice s-au elucidat, dar ele nu vor fi descrise.

Controlul sintezei proteice la eucariote

Rolul poliribozomilor în sinteza proteinelor a fost explicat. În majoritatea ţesuturilor, toţi ribozomii sunt legaţi de ARNm şi sunt implicaţi în sinteza proteică. În anumite ţesuturi, cum este glanda mamară la animale gestante, unii ribozomi nu sunt asociaţi cu ARNm. Activitatea de sinteză proteică a unei celule poate, prin urmare, să fie schimbată, fie prin formare de poliribozomi din ribozomii existenţi fie prin producere de poliribozomi adiţionali.
În oricare din aceste situaţii procesul este descris ca şi control global.
Acesta contrastează cu situaţia în care sinteza unei anumite proteine este schimbată; aceasta este cunoscută ca şi control specific.

Sinteza proteică la eucariote poate fi controlată pe căi multiple. Astfel structura cromatinei suferă schimbări probabil datorate modificării histonelor în nucleozomi. Este dovedit deja controlul nivelului traducerii prin fosforilarea factorilor de iniţiere. În orice caz, controlul primar este la nivelul transcrierii. Aşa cum s-a descris pentru operonul *lac*, acest control specific este făcut de către porţiunea în amonte a ADN faţă de situsul de transcriere şi prin prezenţa multor proteine diferite. Enzima cheie în transcrierea genelor pentru proteine structurale este ARN polimeraza II, aşa cum s-a descris mai sus (p. 28). Aceasta este o enzimă multisubunitară mare. Promotorii recunoscuţi de această enzimă sunt mult mai mari şi mai diverşi decât cei ai operonului *lac*. Caracteristicile generale ale acestor promotori sunt arătate în figura 3.65.

Primul nucleotid (situsul start) al secvenţei ADN este notat +1, urmat de +2 etc. Nucleotidul dinaintea situsului start este notat -1. Acestea se referă la catena cu cod (sens), nu la catena matriţă (antisens).

UCSF LIBRARY

Fig. 3.65. Caracteristicile generale ale promotorilor pentru precursori ARNm în celule eucariote.

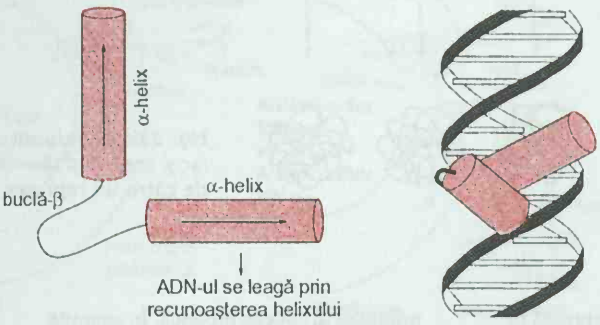


Fig. 3.66. Structură de helix răsucit: motiv proteic pentru proteine care leagă ADN.

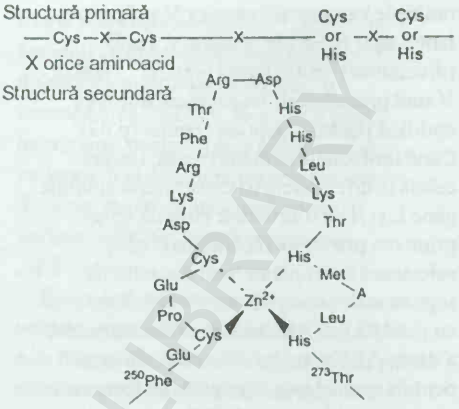


Fig. 3.67. Amprenta de zinc: un alt motiv proteic important pentru legarea ADN.

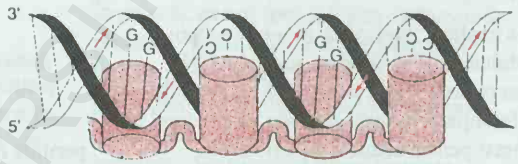


Fig. 3.68. Modelul de legare a amprentei de zinc din TFIIIA la 5S ADN.

Catena sens are aceeași secvență ca și ARNm, cu excepția prezenței unui T în locul lui U. Promotorii pentru ARN polimerază sunt pe latura 5' a startului (în amonte). Există mai multe tipuri; casetele (domeniile) TATA și CAAT sunt foarte frecvente la fel și GC. Activitățile multor promotori sunt amplificate de către secvențe de ADN („enhancers") situate la distanță de până la câteva sute de perechi de baze de promotor. Legarea poate fi la capătul 5' (în amonte) sau 3' (în aval) sau chiar în interiorul genei. Asemenea „amplificatori" sunt recunoscuți de proteine specifice denumite factori de transcriere, care stimulează legarea ARN polimerazei de un promotor vecin. Faptul că amplificatorii sunt adesea așezați la distanță (considerând ADN liniar) față de promotorii pe care îi controlează este explicat pe baza foldingului (împachetării, plierii)) ADN prin care ia naștere o structură terțiară care aduce cele 2 elemente în poziții apropiate (figura 13.15).

Factorii care sunt produși ai genelor, altele decât cele pe care ei le controlează, (care este cazul cel mai întâlnit), sunt denumiți factori „trans-acting". Factorii care sunt produși ai genelor pe care ei le controlează, așa cum s-a arătat pentru operonul *lac*, sunt denumiți factori „cis-acting". La procariote, când diferite gene codificând anumite proteine sunt exprimate ca răspuns la un se mnal anume, genele sunt legate strâns într-un operon, așa cum s-a arătat pentru operonul *lac*, astfel încât are loc o producție coordonată de proteine codificate de gene individuale. În organisme superioare acest fenomen nu are loc întrucât nu sunt ARN policistronici și genele individuale sunt transcrise în ARN monocistronici individuali, codificând proteine singulare. Astfel, trebuie să existe alte căi de coordonare, mai ales că, adesea, genele implicate sunt pe cromozomi diferiți. În acest fel, producerea unei molecule de anticorp funcțional necesită sinteza de proteine imunoglobulinice cu lanț greu (H) sau ușor (L). În timp ce locusul lanțului greu (H) este pe cromozomul 14 la om, genele lanțului ușor sunt pe ambii cromozomi 2 și 22. O situație similară există în cazul hemoglobinei, unde familia α-globinei este pe cromozomul 16 la om și gena β-globinelor pe cromozomul 11.

Factori de transcriere

Chiar dacă secvența bazelor din regiunea promotor a ADN joacă un rol critic în poziționarea situsului start de transcriere, proteinele sunt, de asemenea, implicate. De caseta TATA se leagă un complex de proteine cunoscut ca TFIID (factor de transcriere D pentru ARN polimeraza II).În acest complex, numai o proteină, cunoscută ca TBP („TATA Binding Protein") se leagă direct de ADN, alte proteine ale complexului legându-se prin asociere cu TBP. Anumite gene nu conțin casetă TATA, dar necesită TBP pentru transcriere și s-a postulat că este implicat un alt factor (care se leagă de ADN înainte de TBP).

Recunoașterea ADN de către proteine

S-au depus eforturi pentru a descoperi precis cum factorii de transcriere recunosc secvențe reglatoare în gene. Au fost identificate 3 motive proteice importante: motivul elice-cot-elice („helix-turn-helix"), proteine de tip amprentă de Zn („zinc finger") și proteine fermoar de leucina („leucine zipper"). Primul descoperit, motivul helix-turn-helix" este prezent în proteine care leagă gene homeotice (cele care controlează planul arhitectonic al embrionului). Acest motiv este prezentat în figura 3.66 și este denumit astfel pentru că conține o regiune scurtă care seamănă cu o elice α urmată de un „cot" β și apoi o altă elice α. Acest motiv este prezent nu numai în „homebox"-ul la *Drosophila,* dar și în ADN al bacteriilor care exprimă proteine reglatoare cum este Cro. Figura arată că în legarea de ADN o elice se așează perpendicular pe șanțul mare al moleculei de ADN, în timp ce a doua elice se așează parțial chiar în șanțul mare unde poate contacta specific bazele ADN.

Amprenta Zinc („Zinc Finger")

Acest motiv are structura arătată în figura 3.67 și conține o pereche de resturi de cisteină urmată de aproximativ 12 resturi de aminoacid și o altă pereche de resturi de

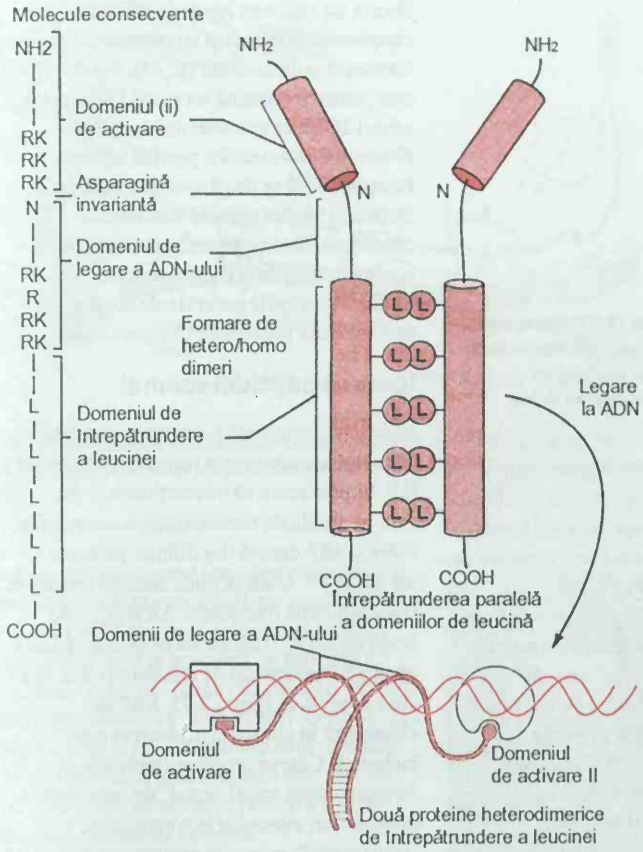


Fig. 3.69. Model al interacţiunilor proteinelor „fermoar" de leucină. Aminoacizii conservaţi care sunt comuni cu proteinele fermoar de leucină sunt leucina (L), arginina (R), lizina (K) şi asparagina (N).

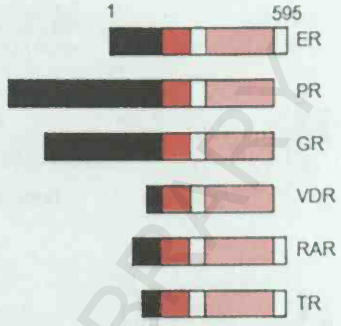


Fig. 3.70. Structura receptorilor hormonali. ER-estrogen; PR-progesteron; GR-glucocorticoid; VDR – vitamina D3; RAR – acid retinoic; TR-tiroxina.

cisteină sau histidină. Perechile de cisteină coordonează ioni Zn^{2+} aşa încât ceilalţi aminoacizi formează o proeminenţă asemănătoare unui deget (finger). Această structură este repetată de 9 ori în factorul de transcriere TFIIIA (factor de transcriere pentru ARN polimeraza III), care se leagă de gena pentru ARN5S, aşa cum se arată în figura 3.68, fiecare „deget" legându-se în şanţul mare al helixului ADN.
Acest model s-a găsit în câţiva factori de transcriere ai ARN polimerazei II.

Fermoarul de leucină

Factorul de transcriere C/EBP, care este implicat în stimularea exprimării unor gene specific hepatice, are o regiune de 35 aminoacizi, din care tot al 7-lea este leucina. O asemenea structură a fost, de asemenea, găsită în protooncogenele Myc, Fos şi Jun (p. 166). Interacţiunea cu ADN este reprezentată în figura 3.69, în care se vede că zona de tip „fermoar" („zipper") leucină nu se leagă direct de ADN; mai degrabă, facilitează dimerizarea proteinei şi oferă structura proteică corectă pentru legarea ADN prin domenii specifice de legare a ADN bogate în arginină şi lizină. Pentru a acţiona ca factori de transcriere, proteinele trebuie să dimerizeze fie ca homodimeri paraleli (de exemplu Fos:Fos), fie ca heterodimeri (de exemplu Fos:Jun) via fermoarul leucină.

Domeniul de bază de legare a ADN al fermoarului leucină a fost găsit şi în alte proteine care nu conţin un fermoar leucină. În această structură domeniul bazic este asociat cu o regiune adiacentă care poate forma o structură helix-buclă-helix, diferită de motivul de tip „helix-turn". Acesta constă în 2 elice amfipatice (coţinând toţi aminoacizii încărcaţi pe o singură parte a helixului) separate printr-o buclă neelicoidală. Acest domeniu de legare a ADN joacă un rol similar cu fermoarul leucină în medierea dimerizării proteinelor şi facilitarea legării ADN prin motive adiacente bazice.

Controlul transcrierii prin hormoni

Aşa cum se va arăta în capitolele următoare, mulţi hormoni îşi exercită efectele biologice prin legare la receptori de suprafaţă celulară care activează mesageri secundari, cum este AMPc. Hormonii steroizi şi tiroxina acţionează în mod diferit. Ei intră în celula ţintă şi se leagă de proteine-receptor specifice în citosol. Aceştia migrează în nucleu şi controlează transcrierea prin legare la ADN şi controlează exprimarea a 50-100 gene. Diferitele proteine receptor posedă o arhitectură similară şi reprezintă o superfamilie. Structura lor este prezentată în figura 3.70. Ele conţin un domeniu înalt-conservat de legare a ADN (roşu), un domeniu de legare a hormonilor (roz), un domeniu variabil N-terminal care interacţionează cu alţi reglatori ai transcrierii (negru). Când hormonul leagă receptorul, domeniul de legare a ADN este blocat.

Figura 3.71 arată structura domeniului conservat de legare a ADN pentru receptorul estrogenic. Un număr de 8 resturi critice de cisteină se leagă la 2 ioni de Zn^{2+}. Substanţele care reduc activitatea hormonilor acţionează prin legare de receptori.

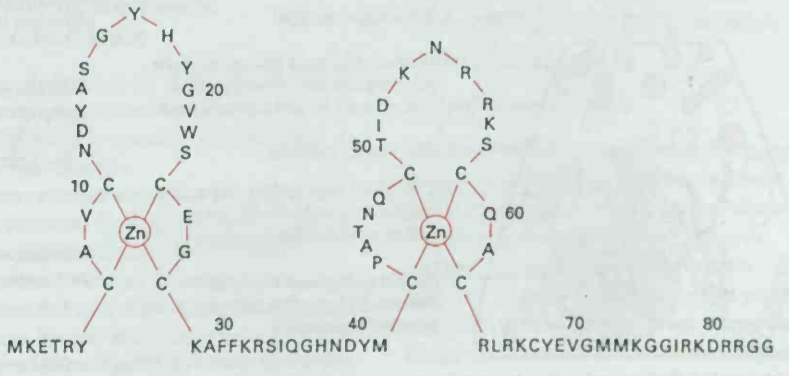


Fig. 3.71. Structura domeniilor conservate de legare a AND pentru receptri estrogenici.

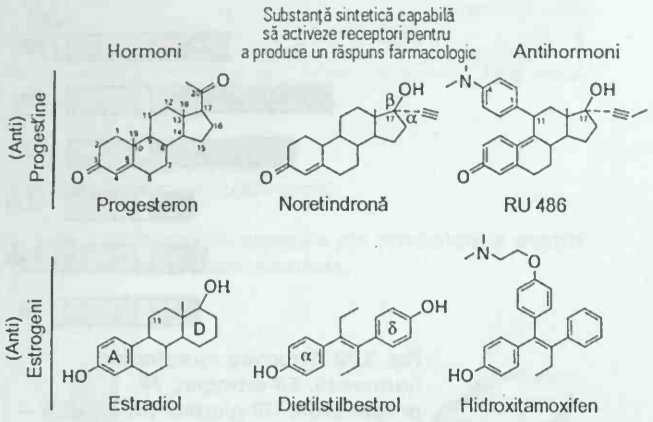


Fig. 3.72. Compararea structurii hormonilor steroidici și a antihormonilor.

Structurile unor astfel de compuși (anti-estrogen și anti-progestine) sunt comparate cu structurile hormonilor corespunzători în figura 3.72. Dietilstilbestrolul a fost primul compus nesteroidic care a demonstrat activitate estrogenică. Hidroxitamoxifenul este un anti-estrogen care este mult utilizat în prevenirea și tratamentul cancerului de sân. RU486 (mifepristone) este utilizat în combinație cu analogii de prostaglandine pentru terminarea sarcinii (gestației).

BIOLOGIA MOLECULARĂ A CELULEI

MIȘCAREA PROTEINELOR

Rolul organitelor

Indiferent de tipul celular, noile proteine sintetizate trebuie să ajungă la destinația lor corectă unde își îndeplinesc funcțiile biologice. Căile prin care se realizează acest lucru reprezintă mișcarea proteică. Acest proces este deosebit de complex în celule eucariote care conțin diferite organite delimitate de membrane. Ca exemplu, figura 3.73 arată o celulă pancreatică. Proteinele destinate a fi secretate din celulă sunt sintetizate în reticulul endoplasmic rugos (RER) de la care ele se mișcă prin celulă și traversează membrana plasmatică. În acest timp, ele se pot modifica fie prin atașarea de grupări prostetice fie prin clivare proteolitică parțială (exemple de modificare post-traducere). RER sintetizează proteine pentru diferite alte destinații. Aceasta include proteine lizozomale și cele reținute în cisternele RE, precum și proteine specifice complexului Golgi. Proteinele destinate nucleului, peroxizomilor și mitocondriilor (cloroplastelor) sunt sintetizate în citosol și de asemenea proteinele citosolice propriu-zise numite proteine de „intendență" („house-keeping"). Mișcarea proteinelor este realizată prin intermediul unor „etichete" de identificare care sunt fie o secvență peptidică dintr-o proteină fie o peptidă adițională la capătul -N sau -C terminal. Aceste secvențe caracteristice sunt denumite secvențe topogenice.

Ribozomi liberi și legați de membrane

Deși toți ribozomii celulelor eucariote au compoziție similară, unii sunt prezenți în citosol nelegați de membrane (ribozomi liberi), iar alții sunt legați de RE. ARNm în citoplasmă se asociază cu ribozomii liberi și formează poliribozomi (p. 34). Dacă ARNm este pentru o proteină secretată (de export), primii 20-25 aminoacizi de la capătul N-terminal formează o peptidă semnal. Poliribozomii se leagă apoi de membrană. Structura multor peptide semnal este cunoscută. Structura lor are puține elemente comune, exceptând regiunea hidrofobică de la mijloc. Principiile generale ale acestor procese sunt prezentate în figura 3.74.

Ipoteza peptidei semnal

În schema originală s-a propus că peptida semnal interacționează direct cu membrana RE. Se știe acum că interacțiunea se face prin particula de recunoaștere a semnalului (SRP). SRP constă din diferite proteine și un ARN 7S. Cum peptida semnal apare din ribozom după traducerea ARNm, ea se leagă de SRP. Traducerea se oprește până când SRP acostează de membrana RE, așa cum se arată în figura 3.75. SRP se eliberează în citosol și traducerea este încheiată. Câteva proteine contribuie la formarea unui canal „apos" de transport al proteinelor, cunoscut sub numele de „translocon", prin care proteina nou formată trece în cisternele RE. Moleculele chaperone (p. 16) din care SRP este un exemplu, joacă un rol în acest proces. Pe măsură ce peptida semnal emerge, ea este eliminată de peptidaza semnal. Produșii primari de traducere conținând peptide semnale sunt denumiți preproteine, de exemplu preproinsulina, hormonul preproparatiroidian etc., așa cum se explică în pag. 32.

Sinteza colagenului

Structura colagenului este descrisă în capitolul 5 (p. 65). În cursul biosintezei acestei proteine insolubile, un precursor

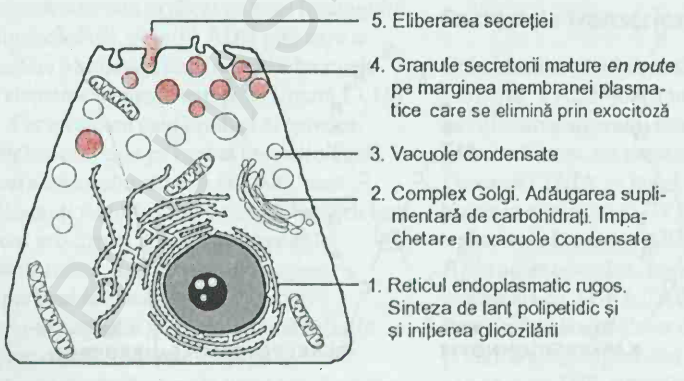


Fig. 3.73. O schemă a celulei pancreatice arătând deplasarea proteinelor sintetizate în reticulul endoplasmatic rugus spre membrana plasmatică.

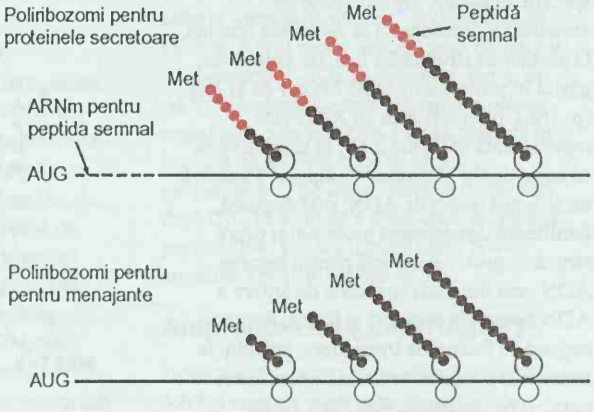


Fig. 3.74. Majoritatea celulelor eucariote au două tipuri de ribozomi: liberi și legați de membrane.

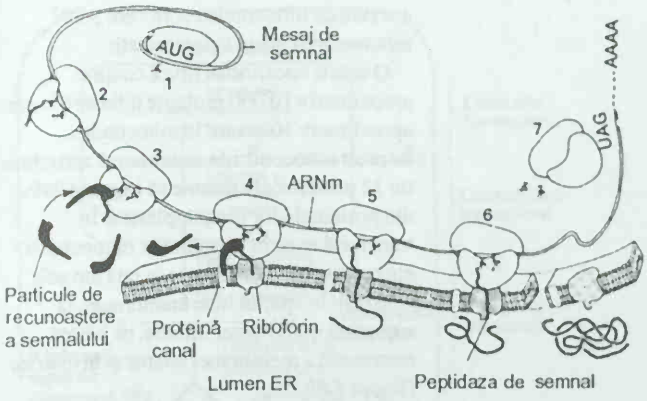


Fig. 3.75. Ipoteza semnalului pentru sinteza proteinelor care intră în cisternele de suprafaţă a reticulului endoplasmatic rugos (ER).

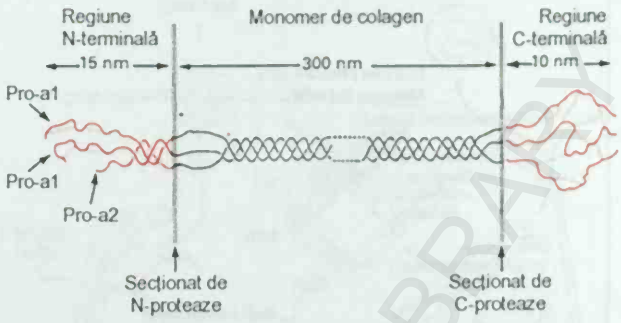


Fig. 3.76. Sinteza colagenului. Liniile punctate indică legături S-S.

proteic, procolagenul (care are extrapeptide la fiecare capăt), este sintetizat conform figurii 3.76. Extrapeptidele conţin legături S-S şi participă la procesul de formare a helixului celor trei lanţuri de colagen, în acest caz reprezentate ca două lanţuri identice (a1) şi unul diferit (a2). Peptidele sunt pierdute fie pe măsură ce procolagenul este secretat fie imediat după secreţie, pentru a rezulta proteina insolubilă colagen.

Rolul aparatului Golgi

Aparatul Golgi este înalt specializat pentru o varietate de funcţii, inclusiv glicozilarea proteinelor şi transportul glicoproteinelor la destinaţii finale. S-au identificat trei compartimente în aparatul Golgi, denumite *cis*, *medial* şi *trans*, aşa cum se arată în figura 3.77. Fiecare compartiment este implicat într-un stadiu diferit al procesării proteinelor. Ultima „staţie" este denumită reţeaua „*trans*-Golgi" (TGN) şi ea joacă un rol esenţial în dirijarea proteinelor spre destinaţii celulare specifice, aşa cum se indică în figură. Sortarea implică asamblarea structurilor împachetate orientate spre citosol. Elucidarea acestor structuri a fost efectuată prin utilizarea unui antibiotic fungic, brefeldina, care opreşte în mod reversibil, exportul proteic dinspre TGN.

S-a observat că aparatul Golgi nu are rol numai în trecerea proteinelor din RE prin membrana plasmatică, dar şi în intrarea proteinelor în celule prin endocitoză.

Cele două enzime prezente în fracţiuni celulare distinse conţinând membrane Golgi sunt galactozil-transferaza (p. 181) care serveşte ca marker pentru membrane *trans* şi N-acetilglucozaminil-transferaza, o enzimă implicată în biosinteza glicanilor complecşi, marker pentru membrane mediale. Aceste enzime sunt sintetizate în RE rugos şi ancorate în membranele Golgi prin domeniul lor specific de inserţie în membrane.

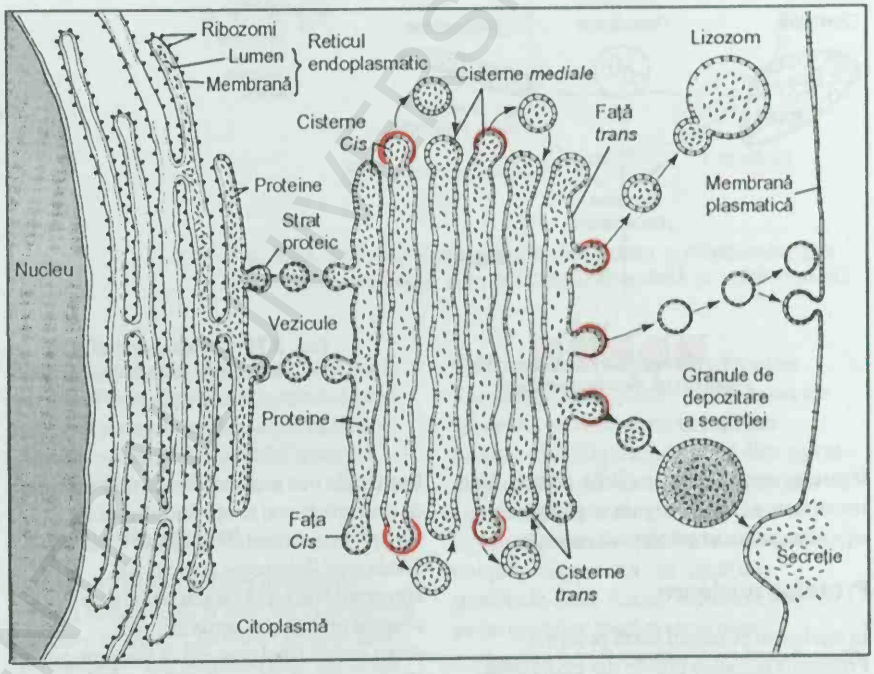


Fig. 3.77. Schemă de ilustrare a trecerii proteinelor din reticulul rugos de suprafaţă prin aparatul Golgi. Cercurile de culoare roşie indică situsul de formare a granulelor.

Enzime lizozomale şi mucolipidozele

Enzimele lizozomale sunt sintetizate în RE ca proteine precursori mari care sunt N-glicozilate în aparatul Golgi aşa cum s-a prezentat anterior.

Pentru ca aceste enzime să fie distribuite spre lizozomi din reţeaua *trans*-Golgi, N-acetilglucozamin-fosfatul trebuie transferat pe resturi de manoză prin intermediul unei enzime specifice. Această enzimă lipseşte în mucolipidoze (boala celulei I şi polidistrofia pseudo-Hurler) în care fibroblastele bolnavilor prezintă corpi denşi de incluziune (de aici denumirea de celule) şi multiple enzime lizozomale sunt secretate în mediu. Pacienţii au nivele anormal de mari de enzime lizozomale în ser şi alte fluide.

Proteine luminale

Anumite proteine sintetizate de RE rugos nu sunt exportate din celulă dar se găsesc în cisternele RE. Asemenea proteine luminale posedă o peptidă cu patru reziduuri la capătul C terminal, având compoziţia Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL). Aceste proteine trec prin sistemul de membrane în aparatul Golgi unde interacţionează cu un receptor şi se reîntorc apoi la cisternele RE. Exemple de proteine cu secvenţa KDEL sunt peptid disulfat izomeraza (PDI) şi proteina de

ASCER UNIVERSITY LIBRARY

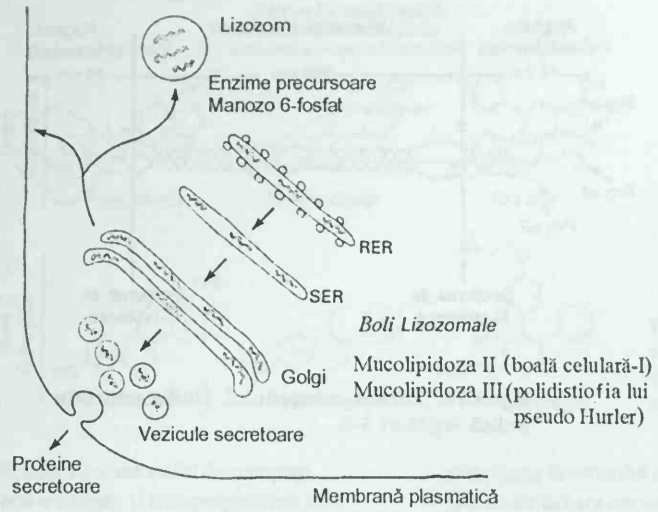


Fig. 3.78. Formarea enzimelor lizozomale: mucolipidoze.

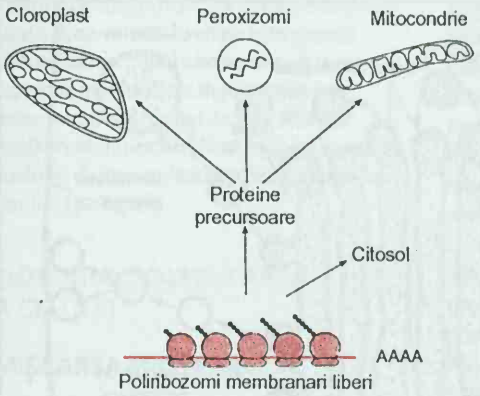


Fig. 3.79. Sinteza proteinelor pe ribozomii „liberi".

legare a imunoglobulinei (BiP), ambele fiind importante pentru a asigura că proteinele exportate au structură terțiară corectă.

Proteine nucleare

În nucleu nu se sintetizează proteine. Proteinele nucleare provin din citoplasmă. În timp ce proteinele mici pot trece liber prin porii nucleari, trecerea proteinelor mari este controlată. Porii nucleari care sunt structuri complexe (p. 3) conținând cel puțin 100 proteine diferite, au un receptor pentru proteine selectate și un mecanism de utilizare a energiei pentru trecerea lor spre interiorul nucleului. Astfel de proteine conțin o peptidă caracteristică, numită secvența de localizare nucleară (NLS), în interiorul structurii lor, care este esențială pentru traversare. În timp ce proteinele intră prin pori, ARN, posibil sub formă de ribonucleoproteină, iese din nucleu prin pori, spre citoplasmă.

Peroxizomii

Aceste organite sunt bogate în enzime care generează apă oxigenată, în special catalaza (p. 76). Ele sunt prezente în ficat și rinichi. Proteinele trec prin membrana peroxizomală ca precursori mai conținând adesea un tripeptid suplimentar la capătul C terminal. Sindromul Zeleweger este o boală autozomal recesivă caracterizată prin absența proteinelor peroxizomale, peroxizomii fiind prezenți ca fantome goale (fără conținut). Figura 3.79 prezintă rolul ribozomilor liberi în sinteza proteinelor.

Originea proteinelor mitocondriale

Din multe puncte de vedere, mitocondriile sunt asemănătoare cu bacteriile procariote și aceasta a condus la conceptul genezei mitocondriilor prin incorporare de bacterii în celule eucariote. Asemănarea lor cu bacteriile privind sinteza proteică a fost explicată (p. 29). ADN mitocondrial derivă numai de la mamă întrucât numai capul spermatozoidului (lipsit de mitocondrii) intră în oocit la fertilizare. Astfel, acele proteine care sunt codificate de genomul mitocondrial provin de la mamă. Acest fapt are semnificație atunci când se urmărește originea diferitelor populații prin antropologie moleculară. Apar însă complicații întrucât fiecare celulă din corp are sute de mitocondrii și fiecare ADN mitocondrial poate suferi mutații.

O celulă eucariotică tipică conține aproximativ 10 000 proteine diferite din care aproximativ 10% sunt în mitocondrii. Întrucât mitocondriile sintetizează aproximativ 12 proteine ele trebuie să importe 99% din proteinele lor din citoplasmă. În transferul acestor proteine la mitocondrii ele trebuie să fie localizate în una din cele 4 poziții: în spațiul intermembranar, la suprafața membranei interne, pe partea matriceală a membranei interne și în matrice (figura 3.80 sus).

Membranele externă și internă conțin sisteme distincte de transport proteic; sistemul pentru membrana externă este denumit Tom (translocaza membranei mitocondriale externe) și respectiv Tim (translocaza membranei mitocondriale interne). Majoritatea proteinelor importate în mitocondrie sunt sintetizate cu o secvență clivabilă N-terminală care este de obicei bazică, lungă de 15-20 aminoacizi și poate forma α-helix amfifilic sau catenă β. Polipeptidele formate interacționează cu molecule chaperon (p. 16) care împiedică plierea și apoi sunt transferate către proteine ce acționează ca „receptori de import proteic" pe membrana externă. Acești receptori furnizează precursorul (cel N-terminal la început), unui canal de conducere a proteinei în membrana externă. În anumite cazuri, precursorul poate fi inserat într-un canal din membrana internă. Aceasta are loc ca răspuns al creșterii potențialului electric transmembranar și prin intermediul unui motor translocator dependent de ATP care este atașat la fața internă a canalului de transport de pe membrana internă. Sistemele Tom și Tim posedă diferite proteine esențiale din care cel puțin una joacă un rol

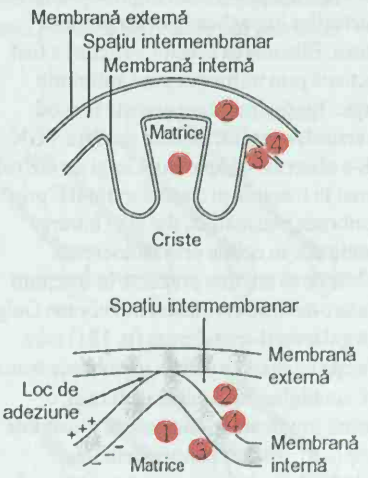


Fig. 3.80. Originile proteinelor mitocondriale.

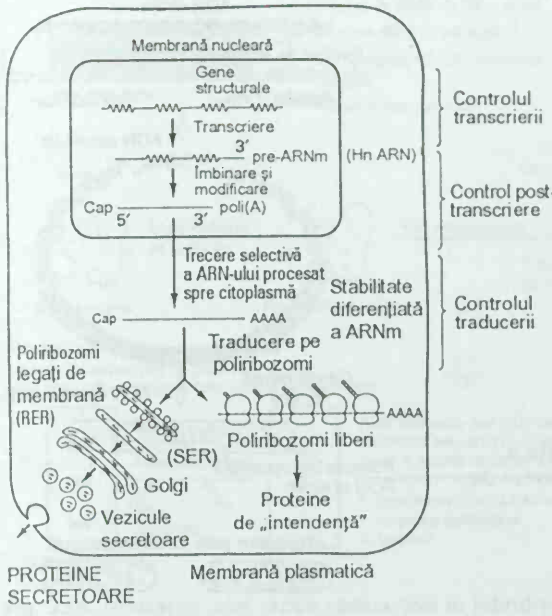


Fig. 3.81. Un rezumat al etapelor de sinteză a proteinelor în celula eucariotă.

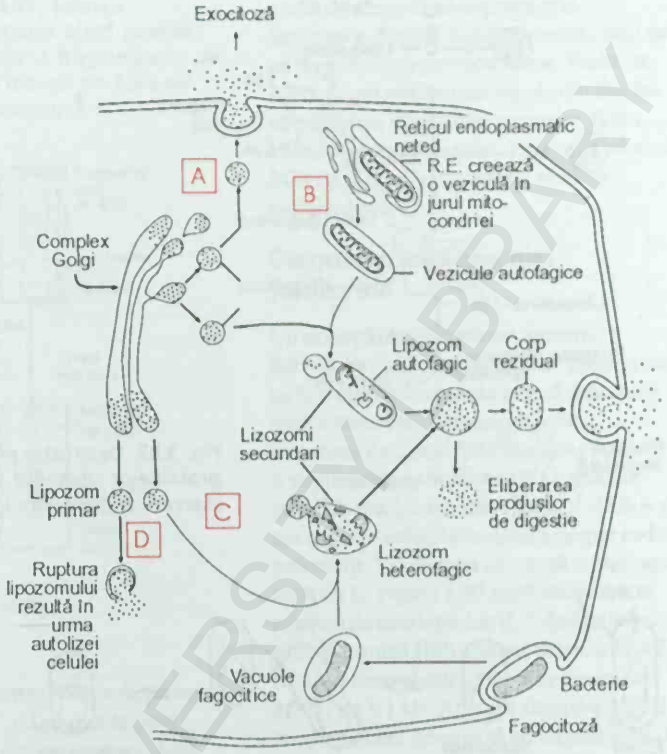


Fig. 3.82. Sistemul lizozomal de degradare a proteinelor şi a altor macromolecule cum sunt polizaharidele şi acizii nucleici.

în ambele sisteme. O molecula chaperon este, de asemenea, prezentă în matrice. Aşa cum se vede în figura 3.80 (jos), trecerea prin cele 2 membrane este favorizată de juxtapunerea strânsă a celor două membrane la nivelul siturilor de contact şi fixare.

SINTEZA PROTEICĂ LA EUCARIOTE (SUMAR)

Figura 3.81 prezintă etapele de exprimare a ADN pentru a produce proteine mature localizate corect în celulă, ceea ce permite realizarea funcţiei lor biologice. Orice obstacol în realizarea acestei arhitecturi poate să aibă efecte negative serioase pentru funcţionarea organismului. Astfel de defecte pot fi cauza de mutaţii, cum este cazul α_1-antitripsinei şi a emfizemului (p. 63). Anumite medicamente cum este fenobarbitalul, provoacă o creşterea a RE neted. Ingerarea de solvenţi organici cum ar fi tetraclorura de carbon şi tricloretilena are efect negativ asupra RER.

DEGRADAREA PROTEINELOR

Principii generale

În cele din urmă, degradarea proteinelor depinde de acţiunea enzimelor proteolitice, acţiune ce va fi explicată ulterior (p. 143). Cum sunt selectate proteinele pentru degradarea lor intracelulară? Ipoteza de lucru este că celulele nu conţin proteine nefolositoare, deci cele care nu sunt necesare trebuie degradate la aminoacizi, care pot fi reciclaţi. Pentru degradarea intracelulară a proteinelor s-au identificat două sisteme generale: sistemul lizozomal şi sistemul ubiquitinei.

Sistemul lizozomal

Figura 3.82 arată formarea lizozomilor primari şi secundari şi rolul lor în procesele digestive celulare. Lizozomii primari care „înmuguresc" din aparatul Golgi pot urma diferite căi: exocitoza (A), transportul proteinelor în afara celulei; fagocitoza (B şi C), formarea de fagolizozomi pentru digerarea organitelor sau a materiilor ingerate; autoliza (D), distrugerea celulei însăşi.

Sistemul ubiquitinei

Ubiquitina este o polipeptidă acidă de 76 aminoacizi care este prezentă efectiv în toate tipurile celulare, de unde şi numele său. Ubiquitina este activată prin interacţiunea ATP cu 2 enzime. Complexul rezultat se ataşează de proteina ţintă ce urmează a fi degradată. Nu se ştie în totalitate modul cum sunt selectate proteinele-ţintă pentru degradare, dar s-a constatat o corelaţie strânsă între natura aminoacidului N-terminal şi a acelora ce îl urmează, cu timpul de supravieţuire a unei proteine într-o celulă. La drojdie, ubiquitina este sintetizată ca o polipeptidă ce conţine 5 secvenţe de ubiquitină şi care apoi este procesată ca să formeze ubiquitina propriu-zisă. Figura 3.83 arată distrugerea programată a proteinelor citosolice prin sistemul de reperare al ubiquitinei. E_2 este o enzimă implicată în transferul ubiquitinei pe resturi de lizină din proteinele-ţintă. Aceste evenimente au loc pe un complex multiproteic numit proteazom („proteasome"), a cărui structură este acum cunoscută.

ADN RECOMBINANT (Inginerie genetică)

Principii generale. Introducere

O demonstraţie timpurie a transferului de ADN de la un tip celular la altul este rezistenţa la medicamente a bacteriilor. Proprietatea de rezistenţă la antibiotice a anumitor tulpini de *E.coli* poate fi transferată la o bacterie patogenă, cum este *Salmonella*.
Explicarea acestui fenomen a dus la descoperirea plasmidei, prin care gena ce conferă rezistenţă la antibiotice stă într-o formă de ADN extracromozomal. Rezistenţa este datorată unei enzime ce catalizează degradarea antibioticului. Figura 3.84 ilustrează acest fenomen.

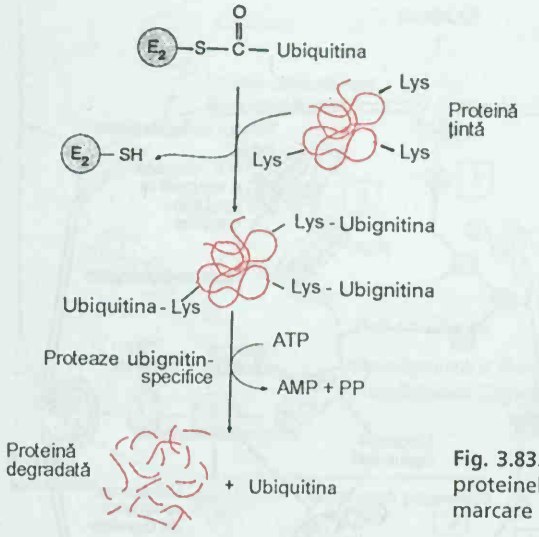


Fig. 3.83. Destrucția programată a proteinelor citosolice prin sistemul de marcare a ubiquitinei.

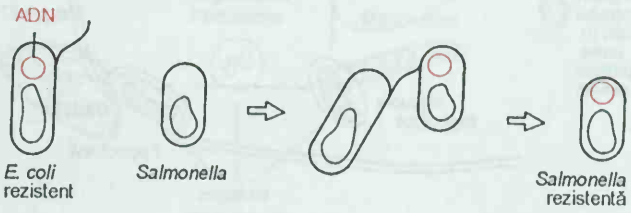


Fig. 3.84. Transferul rezistenței la antibiotice între bacterii prin vector plasmidic.

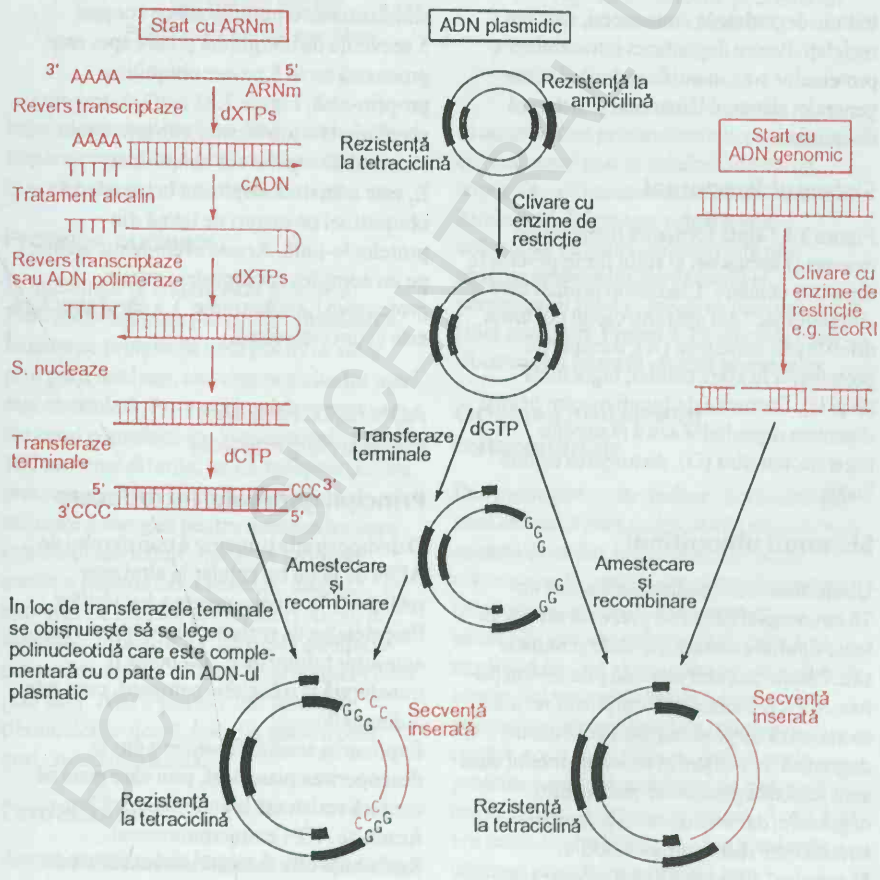


Fig. 3.86. Metode utilizate pentru inserția de ADN străin.

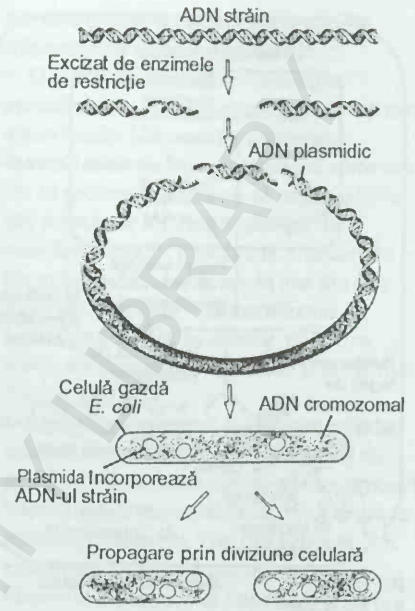


Fig. 3.85. Principii de bază pentru formarea ADN recombinant.

Utilizarea plasmidelor și a altor vectori

Prin inserarea unei gene străine într-o plasmidă, aceasta poate fi utilizată ca vector, rezultând un ADN recombinat care apoi se poate replica într-o gazdă potrivită. Organismul ce conține vectorul modificat se poate multiplica, astfel că, în final, o cantitate cunoscută de vector poate fi recuperată împreună cu ADN străin. În mod alternativ, ADN străin poate fi exprimat astfel încât să dea naștere unei proteine care poate fi recuperată fie prin liza celulelor fie din mediul extracelular. Celulele conținând ADN străin se numesc clone, tehnica prin care se obțin se numește clonare. Principiile generale ale tehnologiei ADN recombinat sunt arătate în fig. 3.85.

Vectori alternativi

Deși până recent *E.coli* și plasmidele sale au fost vectori preferați, acum crește interesul pentru sisteme alternative. Astfel, fagul λ poate fi folosit ca vector în *E.coli*, vector care permite inserarea unor fragmente mari de ADN. Eucariote precum drojdia și celulele renale de hamster tânăr sunt utile pentru că spre deosebire de bacterii, permit glicozilarea proteinelor străine. ADN străin poate fi inserat în celule animale în cultură fie direct sub forma unui precipitat de calciu, fie sub forma unui virus modificat. Uneori particule de aur acoperite cu ADN străin pot fi folosite pentru inserarea acestuia în celule.

Proceduri de inserție a ADN străin

Două metode generale pentru construcția de molecule recombinate sunt prezentate în

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

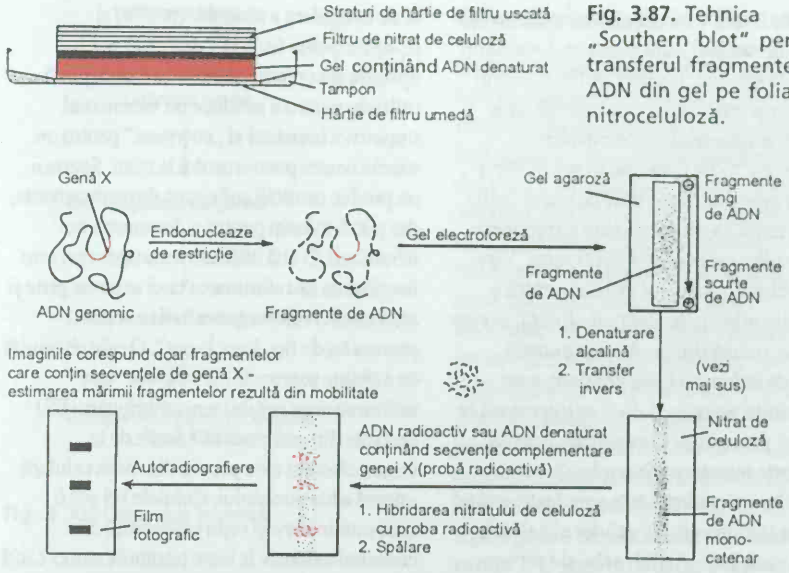


Fig. 3.87. Tehnica „Southern blot" pentru transferul fragmentelor de ADN din gel pe folia de nitroceluloză.

Fig. 3.88. Utilizarea unei probe radioactive în hibridizarea *in vitro*.

figura 3.86. Metoda din stânga începe cu ARNm parțial purificat și se formează ADN dublu catenar complementar (cDNA) cu prelungiri oligo (dC) la capetele 3'. La dreapta, ADN-ul genomic este degradat de o enzimă de restricție în fragmente aproximativ de mărimea unei gene. Plasmida are 2 situsuri de rezistență la antibiotice, unul dintre acestea fiind clivat de aceeași enzimă de restricție utilizată în degradarea ADN. Piesele de mărimea genelor pot fi introduse în ADN plasmidic clivat. Într-o altă variantă, ADN clivat este prelungit cu oligo dG la capetele 5', prin acțiunea unei transferaze terminale (p.24), și recombinat cu cDNA. Gazda este transformată și celulele cu inserția potrivită selectate. Rezistența la antibiotice este utilă în acest caz întrucât, dacă coloniile de bacterii sunt crescute pe un mediu cu tetraciclină, vor crește numai coloniile (clonele) care conțin plasmida.

UTILIZAREA SONDELOR GENETICE

Southern blot

Pentru a detecta într-un gel de agaroză fragmente de ADN complementare cu o secvență dată de ARN sau ADN, Southern a conceput o metodă pentru a transfera ADN denaturat pe o membrană de nitrat de celuloză (nitroceluloză). Fragmentele de ADN pot fi fixate permanent pe membrana de nitrat de celuloză prin încălzire la 80°C. În continuare, o sondă radioactivă poate hibrida ADNc pe suportul de nitrat de celuloză. Metoda, cunoscută ca Southern blot, este ilustrată în figura 3.87. Hârtia de filtru uscată absoarbe soluția tampon din gel împreună cu moleculele de ADN, care vor ajunge în membrana de nitrat de celuloză. O metodă similară pentru ARN este cunoscută ca „Northern blot". Când sunt folosiți anticorpi pentru a detecta proteine după separare electroforetică, procedura de transfer se numește „Western blot".

Cartarea „mapping" situsurilor de restricție în jurul unei gene

Dacă se cunoaște secvența de bază a cel puțin unei părți din gena de interes (gena X în figura 3.88), poate fi preparată o sondă radioactivă, utilizată pentru a se hibrida cu fragmente de ADN separate prin electroforeză în gel, așa cum este ilustrat în figura 3.88. Asemenea sonde pot fi, de asemenea, utilizate cu secțiuni de țesuturi pentru a localiza acidul nucleic. Aceasta este hidridarea *in vitro*.

Diagnostic prenatal

Tehnicile de ADN recombinat pot face posibilă caracterizarea („make-up") genetică a fetusului purtat de mamă. Pe baza cunoașterii statusului fetusului, mama poate, în anumite țări, să poată alege varianta avortului. În primul rând, este necesară o probă de sânge fetal obținută prin *fetoscopie*, după al doilea trimestru, deci este un diagnostic de *gestație târzie*. Probe de ADN se pot obține mai repede din fluidul amniotic sau vilozitățile corionice, fără a afecta siguranța fetusului. Utilizarea tehnicii PCR (p. 27) a făcut posibilă evitarea radioizotopilor.

Diagnosticarea anemiei falciforme

Un exemplu este problema anemiei falciforme („sickle-cell anemia") pentru care au fost elaborate metode care să determine dacă fetusul este homozigot pentru caracterul de celulă falciformă. Așa cum va fi explicat în capitolul 4 (p. 55), mutația genetică este localizată în lanțul β al HbA și, așa cum s-a arătat la secțiunea despre codul genetic (p. 33) mutația cauzează schimbarea lui A cu U. Figura 3.89 arată utilizarea enzimei de restricție *Mst*II. Substituția bazei care determină HbS elimină un situs *MST*II. În ADN normal este generat un fragment *MST*II de 1.1 kb. Absența situsului *MST*II în cele cu HbS generează un fragment *Mst*II mai lung, de 1.3 kb. Heterozigoții au ambele fragmente, homozigoții numai unul.

Sonde oligonucleotidice pot, prin urmare, să fie folosite pentru a detecta gene specifice responsabile pentru o anumită boală. Sunt probleme însă întrucât un fenotip poate rezulta din mutații diferite, așa cum s-a găsit în fenilcetonurie (p. 111). Într-un astfel de caz, sunt necesare multe sonde diferite pentru a oferi un rezultat definitiv.

Utilizarea reacției în lanț a polimerazei (PCR)

Dezvoltarea tehnicii PCR (p. 27) a facilitat mult identificarea mutațiilor care alterează situsurile enzimelor de restricție. În cazul mutațiilor celulelor falciforme un fragment potrivit din gena β-globinei este amplificat de aproximativ 30 de ori, după care fragmente de ADN sunt digerate cu enzime de restricție *Dde*I, al cărui situs de recunoaștere este abolit prin mutația A→T în codonul 6. ADN normal este clivat în 2 fragmente de aproximativ 150 și 201 pb, în timp ce ADN

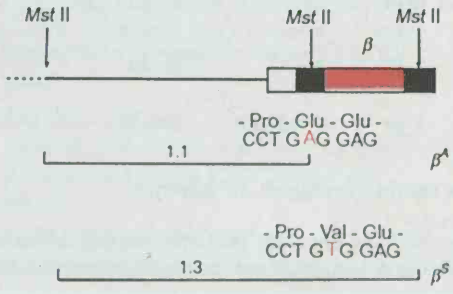


Fig. 3.89. Utilizarea enzimelor de restricție pentru diagnosticul anemiei falciforme.

de la pacienți dă un fragment de 351 bp. Pentru că prin PCR se produce mult ADN, aceste fragmente pot fi detectate fie prin colorare cu bromura de etidiu fie prin colorare cu argint a benzilor ADN din gel. Nu sunt necesare probe radioactive.

Tehnica PCR a dovedit a fi valoroasă în medicina legală, unde cantitatea de ADN disponibil pentru identificare este de obicei foarte mică. ADN uman conține blocuri de nucleotide care se repetă în sistem tandem și se află în regiuni necodificatoare ale genomului. Numărul de repetiții ale blocurilor stă la baza variațiilor individuale. Aceste regiuni hipervariabile se numesc minisateliți. Fragmentele de ADN conținând minisateliți pot fi detectate după separare prin electroforeză. Prin PCR, sunt selectate unități repetitive foarte scurte (STR - Short Tandem Repeats). Astfel, matrița ADN poate fi descrisă la nivel individual și se poate deduce relația individului cu părinții și descendenții („offspring").

Transgeneza

Sunt 3 căi majore de introducere a ADN în țesut geminal mamifer, astfel încât descendentul recipientului va purta gena dorită.

Prima cale implică microinjectarea de soluții cu ADN în nucleul unui ou cu ajutorul unui ac fin. A doua cale, implică utilizarea unui vector de tip retrovirus. Gena dorită este introdusă în genomul retrovirusului. Retrovirusul ADN (sau mai exact cDNA) este apoi introdus într-o linie celulară cultivată, capabilă să producă toate componentele virusului, cu excepția ARN viral. Virusul recombinat este apoi utilizat pentru a infecta un embrion în stadiu incipient, și este plasat la o mamă donor. A treia metodă depinde de existența liniei celulare, care devine celulă germinală dacă se injectează în embrionii prematuri. O variantă a acestei metode este injectarea de nuclei de celule cultivate în ouă nefertilizate anucleate, având în vedere stadiul ciclului celular al celulelor donor și recipient. Astfel, celulele ou sunt stimulate artificial să se dezvolte. Metoda uzuală folosește nuclei de la celule fetale, dar se pot folosi și nuclei ai celulelor adulte, care ar avea mai multe implicații în realizarea de clone umane.

O utilizare practică a animalelor transgenice, cum ar fi capra sau oaia, ar fi introducerea de proteine umane care pot fi apoi extrase din lapte. De exemplu factorul X de coagulare a sângelui (p. 176) și α_1-antitripsina (p. 63). Metodele pot fi aplicate și la plante. Astfel, bananele pot fi utilizate pentru a produce un vaccin oral împotriva hepatitei și „cowpeas" pentru un vaccin contra paravirusului la câini. Șoarecii nu produc cantități suficiente de medicamente, dar pot fi folosiți pentru a demonstra noi tehnologii. O altă utilizare a transgenezei este inactivarea sau eliminarea unei anumite gene și apoi studiul rolului genei în fiziologia șoarecelui de tip „knock-out". O cale obișnuită de a obține șoarecele „knock-out" este utilizarea unor celule stem embrionare (ES) derivate din embrioni la 3,5 zile de la împerechere și care provin din masa celulară internă a blastocistului. Celulele ES pot fi cultivate *in vitro* și reține potențialul de a contribui extensiv la toate țesuturile atunci când sunt injectate înapoi într-un blastocist gazdă, care se poate dezvolta într-o mamă adoptivă. Celulele injectate devin stabilizate în linia germinală de șoarece. Astfel de celule ES pot fi modificate prin introducere de ADN exogen pentru ținte genice. Aceasta depinde dacă celulele sunt capabile să recombine vectorul ADN cu o țintă cromozomală omoloagă. Cum ambele alele pot fi relativ

Tabelul 3.7. Repetiții trinucleotidice în boli genetice umane

Boala	Repetiția[a]	Lungime intermediară în cazuri normale lungime[b]	Lungime intermediară în cazuri normale premutare [b,c]	Lungime în cazuri de boală[b]	Efecte biologice posibile ale expansiunii
Fragmente XA fragile (FRAXA)	$(CGG)_n$	6-52	59-230	230-2.300 (pur)	Repetarea domeniului 5' la regiunea codificatoare; metilarea promotorului, gene silențioase
Fragmente XE fragile (FRAXE)	$(CCG)_n$	4-39	? (31-61)	200-900	Metilarea promotorului, gene silențioase
Fragmente XF fragile (FRAXF)	$(CGG)_n$	7-40	?	306-1.008	Metilarea promotorului, gene silențioase
Fragnmente FRA16A	$(CCG)_n$	16-49	?	1.000-1.900	Metilarea promotorului, gene silențioase
Sindrom Jacobsen (FRA11B)	$(CGG)_n$	11	80	100-1.000	Metilarea promotorului, gene silențioase
Sindromul Kennedy (SMBA)	$(CAG)_n$	14-32	?	40-55	Expansiunea capătului poliglutaminei
Distrofie miotonică (DM)	$(CTG)_n$	5-37	50-80	80-1.000 congenital 2.000-3.000	Repetiția capătului 3' în regiunea codificatoare; degradarea procesării ARNm și a transportului, degradarea exprimării genice datorită schimbărilor cromatinice
Boala Huntington (HD)	$(CAG)_n$	10-34	36-39	40-121	Expansiunea poliglutaminei
Ataxia spinocerebelală 1 (SCA1)	$(CAG)_n$	6-39	...	40-81 (pur)	Expansiunea poliglutaminei
Ataxia spinocerebelală 2 (SCA2)	$(CAG)_n$	14-31	...	34-59 (pur)	Expansiunea poliglutaminei
Ataxia spinocerebelală 3 (SCA3)/ Boala Machado Joseph (MJD)	$(CAG)_n$	13-44	?	60-84	Expansiunea poliglutaminei
Ataxia spinocerebelală 6 (SCA6)	$(CAG)_n$	4-18	?	21-28	Expansiunea poliglutaminei
Ataxia spinocerebelală 7 (SCA7)	$(CAG)_n$	7-17	?	38-130	Expansiunea poliglutaminei
Sindromul Haw River (HRS; vezi DRPLA)	$(CAG)_n$	7-25	?	49-75	Expansiunea poliglutaminei
Ataxia Friedreich (FRDA)	$(GAA)_n$	6-29	? (>34-40)	200-900	Domeniu repetitiv intronic, producerea ARNm modificat, replicare alterată

[a] În mod normal, domeniile repetitive conțin întreruperi de secvențe
[b] Număr de repetiții triplet
[c] Semnul de întrebare (?) indică lungimea internmediară potențial mutagenă iar semnul (...) indică lipsa acestui potențial. Nu toate bolile sunt asociate cu o repetiție premutantă sau cu condiția premutației

Fig. 3.90. Genetica inversă.

Genetica inversă

Cazul anemiei falciforme este un exemplu bun de clonare funcţională în care se cunoaşte funcţia genei aberante. În multe boli genetice, cum este boala autozomală dominantă Hungtington, funcţia genei aberante este necunoscută. În asemenea cazuri, strategia implică corelarea fenotipului cu deleţia cromozomală. Gena lipsă, prezentă la normali, este secvenţializată, este dedusă apoi secvenţa de aminoacizi şi funcţia genei prezise. Figura 3.90 arată etapele aplicării acestei proceduri. Această strategie se numeşte clonare poziţională. Un succes al acestei strategii îl reprezintă baza genetică a fibrozei chistice. Prin utilizarea unor markeri stADNard de legare gena a fost localizată pe cromozomul 7. O genă ADNcidat a fost localizată şi secvenţializată. Compararea secvenţei cu proteine cunoscute oferă cheia funcţiei. Gena codifică pentru reglatorul conductanţei transmembranare în fibroza chistică (CFTR) un canal clorură ce necesită pentru deschidere atât fosforilare cAMP-dependentă cât şi hidroliza ATP. A fost de asemenea studiată cauza distrofiei musculare Duchenne. Gena implicată a fost localizată pe cromozomul X şi codifică o proteină numită distrofină (Mr e 400 000). Funcţia precisă a acestei proteine încă nu se ştie.

Cazul bolii Huntington este un exemplu al unui alt fenomen care apare tot mai frecvent şi anume apariţia unor expansiuni nestabile de trei nucleotide şi alte repetiţii (tabel 3.7). Lungimea unei repetiţii este corelată cu vârsta la care apare boala, sau în cazul unui sindrom X fragil (situsurile fragile sunt identificate ca zone necolorate din cromozomi care pot fi induse prin anumite condiţii de cultivare a ţesuturilor), până la riscul de a avea copii afectaţi de boală. Repetiţiile pot apărea normal în genom şi pot fi repetiţii perfecte (de exemplu fără variaţii în compoziţia bazelor azotate) sau repetiţii imperfecte. Când sunt localizate în ser lângă secvenţe transcrise, repetiţia expandată poate avea efect fie asupra genei transcript, fie asupra genei produs care poate cauza boala. În boala Huntington repetiţia este CAG şi în sindromul fragil X, CGG. Procesul prin care sunt generate repetiţiile se numeşte mutaţie dinamică.

uşor rupte, poate fi generată o mutantă nulă. (De exemplu) eliminarea genei pentru proteina prion care are rol în infectarea animalelor în encefalopatia spongiformă bovină. Şoarecele rezultat prin aceste manipulări a apărut ca normal.

SCURT GLOSAR AL TERMENILOR NEEXPLICAŢI ANTERIOR

Familia Alu a ADN
Cea mai abundentă grupare de secvenţe repetitive la mamifere, prezentă în genom. Secvenţa umană Alu constă în 300 perechi de baze (bp) şi apare de aprox. 300 000 ori. secvenţa Alu este eliberată prin acţiunea enzimei de restricţie Alu, de aici provenind şi numele ei.

Amplificare
1 Tratament care are ca scop creşterea proporţiei de ADN plasmidic faţă de ADN bacterian
2 Replicarea unei biblioteci de gene „en gros"

Clonare de tip „cosmid"
Tehnică de clonare a fragmentelor mari eucariote in Escherichia coli. Utilizează situsuri „cos" monocatenare la fiecare capăt al fagului λ , necesare pentru împachetarea în capetele fagului.

Mutaţia cadrului de citire
O mutaţie care este determinată de inserţia sau deleţia a una, două sau multiple perechi de nucleotide şi efectele căruia sunt de schimbare a cadrului de citire a codonilor pe durata sintezei proteice, rezultând o secvenţa aminoacidică diferită pornind de la codonul modificat.

Proteine de fuziune
Proteine hibride conţinând secvenţe de aminoacizi specifici de bacterii şi eucariote. Sunt în mod deosebit utile pentru purificarea proteinelor exprimate de ADN întrucât una dintre proteine poate fi supusă cromatografiei de afinitate.

Genom
Totalitatea genelor dintr-un organism sau individ.

Colonie de testare Grunstein-Hogness
Procedură de hibridare pentru identificarea clonelor plasmidice (coloniile sunt transferate pe un filtru şi hibridate cu o probă adecvată)

Gene de şoc termic
Temperaturile înalte şi alte tratamente de inducere a stresului stimulează exprimarea genelor de şoc termic la drojdii şi alte eucariote care induc sinteza de proteine de şoc termic

Heteroduplex
O moleculă de ADN a cărui dublu helix provine de la indivizi diferiţi, astfel încât pot fi unele perechi de baze sau linii de perechi de baze care nu sunt complementare

Inversie
Alterarea unei molecule de ADN rezultată prin eliminarea unui fragment, inversarea orientării sale şi replasarea sa la locul potrivit.

Polimeraza Klenow
AND polimeraza I are activitate exonucleazică în absenta dNTPs şi degradează lanţuri monocatenare ale duplexului AND în ambele direcţii. Eliminarea unei părţi a lanţului polinucleotidic pentru a produce polimeraza fragmentului Klenow eliberează numai activitatea exonucleazică 3'→5'

Linker
Un fragment mic de ADN de sinteză care are un situs de restricţie util pentru scindarea unei gene întrucât poate fi adăugat ca extensie la un ADN străin.

Fag M13
Un fag de ADN monocatenar. Forme replicativă dublu-catenară poate fi utilizată ca vector de clonare.

Metalotioneină (MMT)
Proteină de legare a metalelor care este indusă în celule animale de o varietate de metale (de ex. zinc). Exprimarea unei proteine de fuziune poate fi reglată utilizând promotorul genei MMT fuzionat la regiunea de codare a proteinei de interes.

Proteina de translaţie Nick
Procedeu de marcare a ADN *in vitro* utilizând ADN polimeraza I pentru a crea o zonă de „Gap" într-un lanţ monocatenar de ADN şi apoi de a-l umplea prin sinteza unei nucleotide marcate

Cadre de citire deschise
Lanţ continuu de codoni tripleţi din ADN care nu sunt întrerupţi de către un codon stop de traducere..

Palindrom
Secvenţa auto-complementară de acid nucleic , de ex. o secvenţă identică cu cea compelmentară (ambele citite în aceeaşi direcţie 5'→ 3')

Hărţi de restricţie
Localizarea unor situsuri multiple în ADN, susceptibile la scindare de către o varietate de enzime de restricţie. O asemenea hartă poate indica omologia cu diferite moleule de ADN.

Transducţie
Infecţia unei celule cu ADN izolat sau ARN dintr-un virus sau vector viral.

Transformare
Introducerea unui ADN exogen (agent de transformare) într-o celulă.

Cromozom artificial de drojdie (YACs)
Un vector de clonare format din plasmide bacteriene, doi telomeri (capete cromozomale) de drojdie, centromer de drojdie sau alte elemente care permit introducerea unor fragmente de ADN. Vectorul poate fi introdus în drojdie, unde funcţionează ca şi cromozom artificial.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Structura și funcțiile proteinelor având hemoglobina drept exemplu

4

Sunt descrise în prima parte caracteristicile proteinelor globulare și fibrilare, apoi distribuția aminoacizilor într-o proteină globulară și date despre natura legăturii peptidice. Structurile de tip „α-helix" respectiv „foaie pliată-β" sunt descrise ca fiind componente importante atât în proteinele fibrilare cât și în cele globulare. Sunt date apoi structurile mioglobinei și hemoglobinei, precum și interacțiunile ce apar în subunitățile hemoglobinei în formarea structurii sale cuaternare. Importanța polimorfismului hemoglobinei legat atât de proteinele normale, cât și de cele anormale este decrisă cu referire particulară la hemoglobina din celule caracteristice anemiei falciforme. Sunt scoase în evidență proprietățile mioglobinei și ale hemoglobinei, în special curba sigmoidală de saturare a hemoglobinei cu oxigen și modularea sa prin intermediul difosfogliceratului. Sunt explicate rolul fiziologic al acestui modulator și caracteristicile unor hemoglobine anormale. Capitolul se încheie cu o serie de considerații despre structura terțiară a proteinelor, identificarea domeniilor și a motivelor structurale («motifs»), respectiv despre conceptul de familii și super-familii ale proteinelor. Este descrisă structura serpinelor ca un exemplu al unei astfel de super-familii. Este explicată descendența din gene ancestrale a proteinelor omologe folosind lizozimul și α-lactalbumina ca exemple.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

PROPRIETĂŢILE PROTEINELOR

Existenţa celulelor vii depinde de prezenţa a mii de proteine diferite care se combină cu alte molecule, cu o mare precizie. Combinarea poate implica alte proteine, ca de exemplu în cazul contracţiei musculare, sau o gamă complexă de alte substanţe neproteice. De aceea, enzimele, care sunt în mod normal proteine, se combină cu substratul lor la situsul activ al proteinei, gradul de combinare depinzând adeseori de legarea unei alte substanţe la un alt situs. Controlul exprimării genetice, aşa cum s-a arătat în capitolul 3, depinde de legarea dintre ADN şi proteine, iar controlul prin intermediul hormonilor implică interacţiunea dintre aceştia şi receptorii situaţi fie pe membrana plasmatică, fie în citoplasmă. Transportul prin membrane depinde de interacţiunile proteinelor cu solutul, activitatea nervoasă implică interacţiuni între substanţele transmiţătoare şi proteine, iar protecţia imună implică interacţiuni de tipul antigen-anticorp. Aceste interacţiuni specifice vor fi descrise în capitolele 5, 15 şi ulterior în text. Unele proteine sunt încadrate într-o categorie intermediară între cele fibrilare şi cele globulare. Ele au structuri alungite precum proteinele fibrilare, dar sunt solubile în soluţii apoase, la fel ca proteinele globulare. Miozina şi fibrinogenul sunt exemple din această categorie.

PLIEREA PROTEINELOR GLOBULARE

PRINCIPII GENERALE

Caracteristicile proteinelor globulare şi fibrilare

În capitolul 2 au fost descrise caracteristicile fundamentale ale proteinelor, punându-se accentul pe structura primară. Din proprietăţile cunoscute ale proteinelor este evident că ele nu pot fi alcătuite doar din lanţuri polipeptidice lungi, ci trebuie să posede o structură mult mai complicată. În funcţie de componenta polipeptidică, proteinele se pot împărţi în două clase principale: proteine fibrilare şi globulare. Proteinele fibrilare sunt rezistente, insolubile în apă sau în soluţii diluate de săruri. Lanţurile lor polipeptidice sunt aranjate de-a lungul unei axe, formând fibre sau foi.

Câteva proteine fibrilare tipice vor fi descrise în capitolul 5, dar actina si cheratina sunt exemple clasice. Proteinele globulare au lanţurile lor polipeptidice strâns înfăşurate în structuri sferice sau globulare. Majoritatea sunt solubile în soluţii apoase. În acest capitol hemoglobina va fi dată ca exemplu; alte proteine globulare, cum sunt anticorpii sau cele întâlnite în ser, vor fi descrise în capitolul 5.

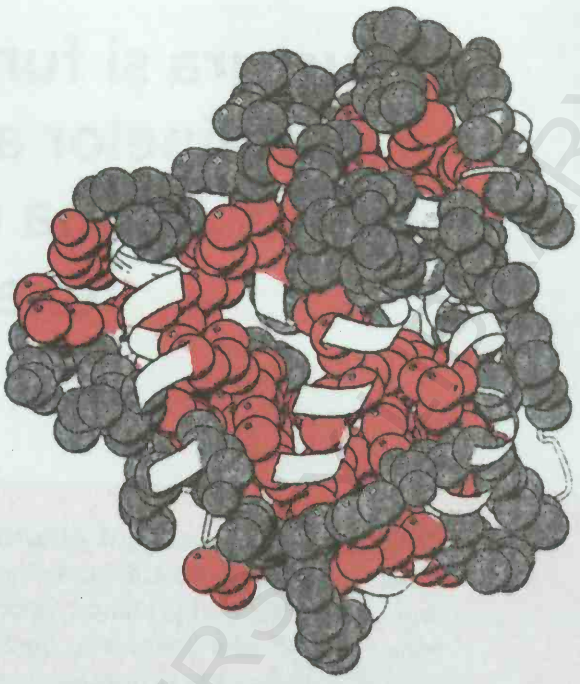


Fig. 4.1. Lanţul polipeptidic al unei proteine globulare se pliază astfel încât resturile nepolare tind să fie îngropate pentru a forma un interior hidrofob, având grupele polare situate la suprafaţa hidrofilă a proteinei.

Distribuţia aminoacizilor într-o proteină globulară

Lanţul polipeptidic al unei proteine globulare se pliază astfel încât resturile nepolare tind să fie îngropate pentru a forma un interior hidrofob, în timp ce grupările polare se situează pe suprafaţa hidrofilă a proteinei. Fig 4.1 ilustrează caracteristicile generale ale unei proteine globulare, reprezentate de mioglobină. Resturile hidrofobe (Val, Ile, Leu, Phe, Tyr, Trp) sunt colorate cu roşu, iar cele ce poartă sarcini electrice sunt negre. O caracteristică a enzimelor (vezi cap. 7) este faptul ca adesea ele prezintă o fisură orientată înspre interiorul proteinei şi care poate conţine unele grupări polare.

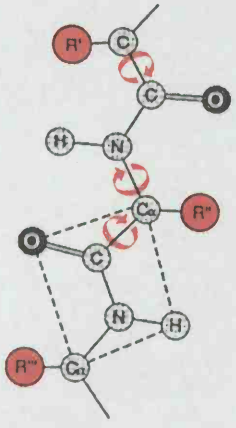


Fig. 4.2. O caracteristică a legăturii peptidice constă în faptul că rotaţia în jurul legăturii este limitată.

Legăturile de hidrogen (vezi pag. 12) joacă un rol important în plierea proteinelor. În proteinele fibroase structura de tip α-helix este în mod particular esenţială, dar ea joacă un rol important şi în proteinele globulare. Aceleaşi consideraţii se referă şi la cealaltă conformaţie, cea de foaie pliată de tip β.

Natura legăturii peptidice

În capitolul 2 s-a menţionat că legătura peptidică este rigidă, permiţând numai o rotaţie

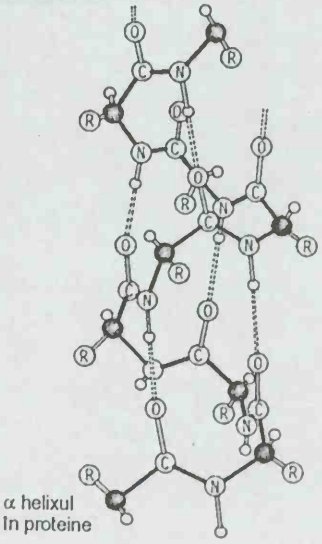


Fig. 4.3. Structura α-helix. Legăturile de hidrogen ajută la menţinerea acestei conformaţii.

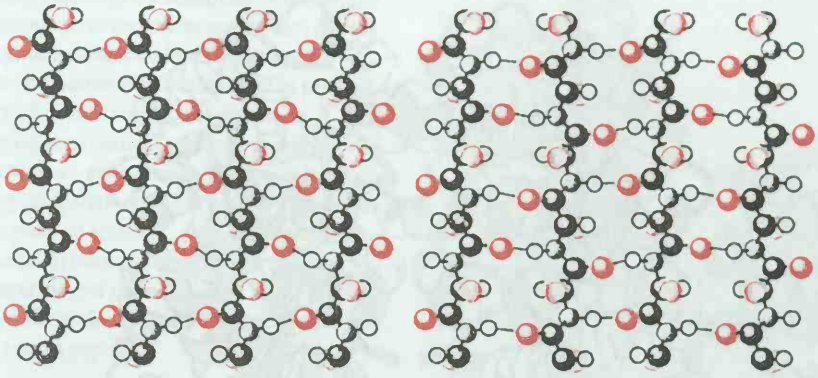


Fig. 4.4. Structura de foaie pliată β în care se asociază lanțurile prin legături de hidrogen. Lanțurile sunt paralele în partea stângă și antiparalele în partea dreaptă. Sunt figurați atomii de oxigen (roșii) din legăturile peptidice formând legături de hidrogen.

limitată. Acest fapt este ilustrat în fig. 4.2. Se va vedea că, într-un lanț peptidic, rotirea este posibilă numai între anumiți atomi. Structura CαCONHCα este plană.

Structura de α-helix

Structura de α-helix conține un număr maxim de punți de hidrogen, cu 3,6 resturi de aminoacizi per spiră, așa cum se indică și în fig 4.3. Pentru a forma o astfel de structură, lanțul polipeptidic este răsucit spre dreapta în formă de α-helix .

Conformația β

Un lanț polipeptidic care nu conține punți de hidrogen se află în conformație de tip β. Un lanț monocatenar aflat în conformația β, spunem că reprezintă o «catenă β». Astfel de lanțuri β pot interacționa unele cu altele, așa cum se arată și în figura 4.4. Radicalii R se află în planuri opuse față de punțile de hidrogen, așa că ei nu pot interacționa. Lanțurile pot fi paralele (de exemplu cu grupări NH_2 și COOH orientate în aceeași direcție, stânga) sau antiparalele (dreapta). Aceste structuri se numesc foi pliate de tip β și ele sunt întâlnite nu numai la proteinele fibroase, dar și în structura terțiară a proteinelor globulare, așa cum se va arăta.

În proteine, structurile tip α-helix și catenele β sunt conectate prin regiuni de tip „buclă".

Proteinele globulare care conțin foi pliate se consideră că se află în conformație β.

Reprezentarea α-helixurilor și a catenelor β

Pentru a simplifica diagramele structurale ale proteinelor, s-au adoptat convenții de reprezentare a structurilor lor secundare. Un α-helix se reprezintă ca un cilindru plin, uneori având o spiră în interior, sau mai des ca o panglică spiralată, așa cum se arată în fig. 4.5A. Porțiunile individuale ale catenelor β care participă la formarea foii pliate de tip β, se reprezintă sub forma unor săgeți late (fig. 4.5B). Lanțurile nestructurate de la oricare din capete sunt acele bucle care conectează fie α-helixurile, fie catenele β (fig. 4.5C). Două ramuri β antiparalele (fig. 4.5C) se mai numesc și „agrafe β". Un lanț polipeptidic lung aflat în configurație β se va răsuci întotdeauna ușor spre dreapta, de aceea în structura proteinelor, săgețile sunt desenate de obicei având această răsucire.

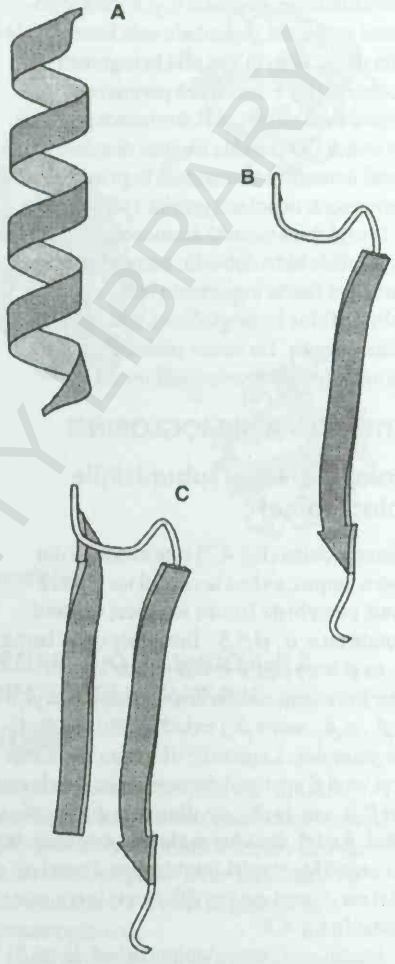


Fig. 4.5. Convenții utilizate pentru denumirea structurilor: (A) α helix, (B) catene β, (C) catene β antiparalele, ac de păr β.

STRUCTURA ȘI PROPRIETĂȚILE MIOGLOBINEI ȘI ALE HEMOGLOBINEI

STRUCTURA MIOGLOBINEI

Arhitectura mioglobinei include opt regiuni spiralate, cum se vede și în fig. 4.6. Acestea sunt notate cu literele A-H; regiunile care unesc spiralele se notează cu perechi de litere (de exemplu FG unește spiralele F și G, nearătate în desen).

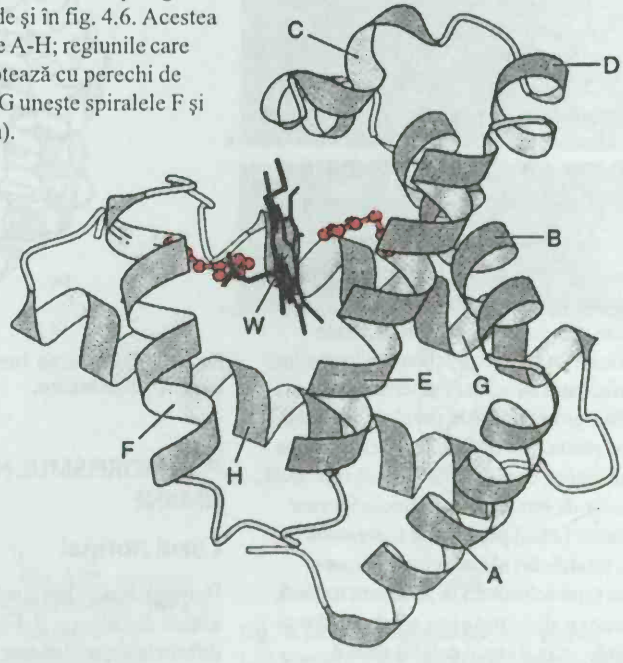


Fig. 4.6. Structura spațială a mioglobinei include opt regiuni helicoidale. Moleculele de histidină care interacționează cu hemul sunt colorate în roșu.

Histidinele din spiralele E şi F interacţionează cu hemul pe ambele sale laturi. Molecula de oxigen (O_2) se află în regiunea W. Spiralele E şi F formează pereţii unei cutii pentru hem, B, G, şi H formează podeaua, iar colţul CD închide capătul deschis. Buzunarul hemului se constituie în principal din aminoacizi nepolari (grupul 1).

Mioglobina posedă aminoacizi cu sarcină în poziţiile hidrofobe din hemoglobină şi care sunt foarte importante în menţinerea subunităţilor hemoglobinei, aşa cum se va arăta ulterior. De aceea moleculele de mioglobină nu se asociază între ele.

STRUCTURA HEMOGLOBINEI

Compararea cu subunităţile mioglobinei

Hemoglobina (fig. 4.7) este alcătuită din patru lanţuri, având la rândul lor fiecare două perechi de lanţuri identice; ele sunt notate cu $\alpha_1\alpha_2$ şi $\beta_1\beta_2$. Între cele două lanţuri α, ca şi între cele β există puţine legături. Dar între lanţuri diferite (de exemplu $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_1\beta_2$, $\alpha_2\beta_1$, sau $\alpha_2\beta_2$) există legături hidrofobe puternice. Legăturile dintre un monomer α şi unul β sunt mai puternice decât cele α-α ori β-β, sau decât cele dintre un dimer $\alpha\beta$ şi altul. Astfel, dacă hemoglobina este disociată cu uree 8M, rezultă întotdeauna dimeri $\alpha\beta$ şi mai rar dimeri $\alpha\alpha$ sau $\beta\beta$. Acest lucru este arătat în fig. 4.8.

Lanţul α al hemoglobinei diferă de cel β prin suprimarea unui rest în segmentul NA, prin adiţia a două resturi în colţul AB şi deleţia a şase resturi în segmentul CD şi în spirala D.

Legarea oxigenului de hemoglobină are ca rezultat deplasarea lanţurilor α_1 şi β_1, ca o unitate, în raport cu lanţurile α_2 şi β_2. Deoxihemoglobina se consideră că are structura T (tensionată), iar oxihemoglobina structura R (relaxată).

Formarea structurii cuaternare a hemoglobinei

Această structură este prezentată în fig. 4.9; cele patru lanţuri interacţionează pentru a da o structură compactă, esenţială pentru funcţionarea corectă a proteinei. Orice modificare în structura primară a lanţurilor, care afectează structura cuaternară, va modifica proprietăţile hemoglobinei. Deşi această pliere este întâlnită în hemoglobina fiecărei specii care posedă această moleculă, un număr de numai zece aminoacizi sunt invariabili (adică prezenţi în toate cazurile). Unele modificări ale structurii primare produc mici schimbări în structura terţiară, în vreme ce altele pot avea efecte mult mai profunde, cum e cazul celulei seceră («sickle cell») de hemoglobină mutantă (vezi în continuare).

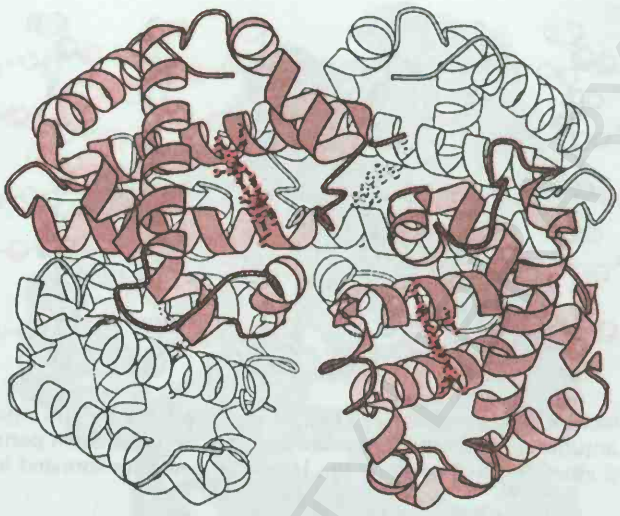


Fig. 4.7. Aranjarea spaţială a celor patru monomeri de hemoglobină.

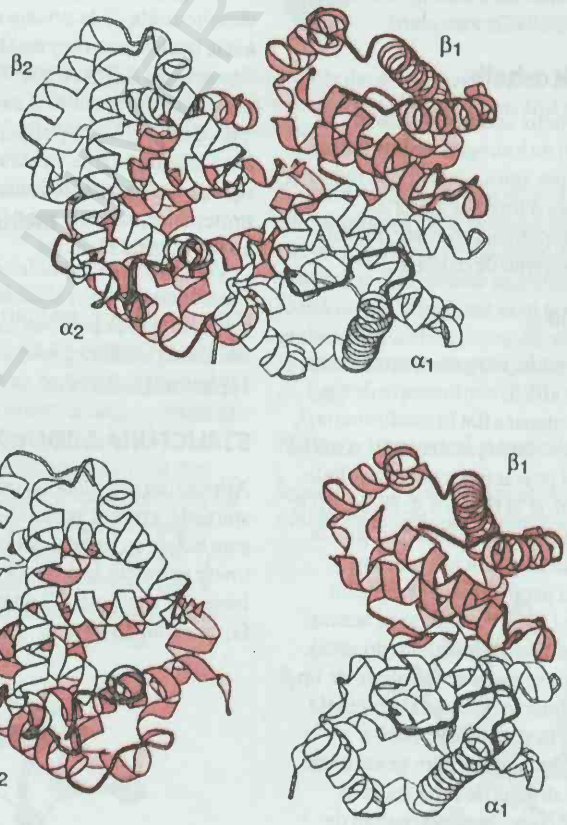


Fig. 4.8. Disocierea hemoglobinei de către uree determină formarea de dimeri cu lanţuri amestecate.

POLIMORFISMUL HEMOGLOBINEI UMANE

Cazul normal

Hemoglobinele pot conţine şi alte lanţuri alături de cele α şi β. Fig. 4.10 prezintă diferitele tipuri de hemoglobine prezente în organismul uman sănătos şi care apar ca urmare a exprimării genei «loci». În mod deosebit, trebuie consemnat că hemoglobina fetală diferă de cea a adultului.

Exemple de înlocuiri în structura primară.

În fig. 4.11 resturile ce iau parte la legăturile $\alpha_1\beta_1$ şi $\alpha_2\beta_2$ sunt colorate cu roşu. Poziţia altor variabile care nu produc simptome clinice sunt colorate doar pe jumătate cu

roșu. Așa cum s-a menționat anterior, un aminoacid invariant este acela care a fost regăsit neschimbat în secvența tuturor hemoglobinelor analizate până în prezent. Există astfel numai două resturi de aminoacizi comuni tuturor hemoglobinelor: histidina – ce se leagă covalent cu fierul din hem și fenilalanina – în poziția 1 a buclei formate de spirele C și D, care inserează hemul în buzunarul său. Toate celelalte resturi se pot înlocui, dar în 33 de poziții specifice înlocuirile sunt restricționate doar la resturi nepolare.

Hemoglobina celulei seceră („sickle-cell") (HbS)

Așa cum s-a arătat în capitolul 3, anemia falciformă („sickle-cell disease") este un excelent exemplu de boală moleculară în care hemoglobina mutantă este produsă printr-o mutație într-un singur punct prin care schimbarea unei nucleotide din genă cauzează înlocuirea acidului glutamic din lanțul β cu valină. Aceasta are un efect minor asupra proprietaților fiziologice ale HbS oxigenate și celulele roșii par a fi normale cum se vede și în fig. 4.12 (a); Totuși, HbS deoxigenată formează filamente tip baghetă („rod-like") (c) care cauzează formarea celulelor roșii de tip seceră.

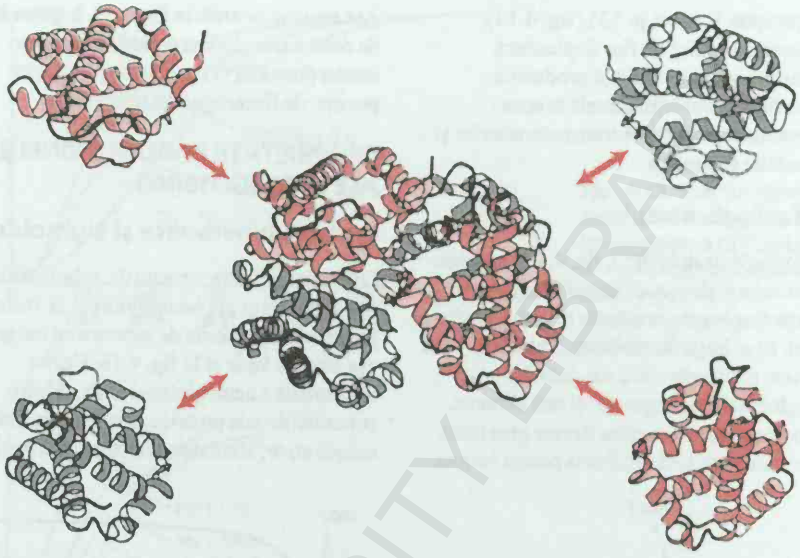


Fig. 4.9. Formarea structurii cuaternare a hemoglobinei.

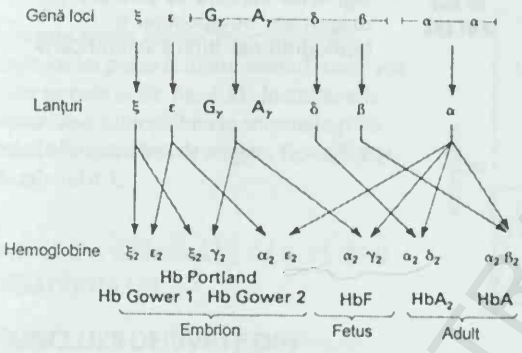


Fig. 4.10. Polimorfismul hemoglobinei umane apare ca rezultat al expresiei diverselor gene loci.

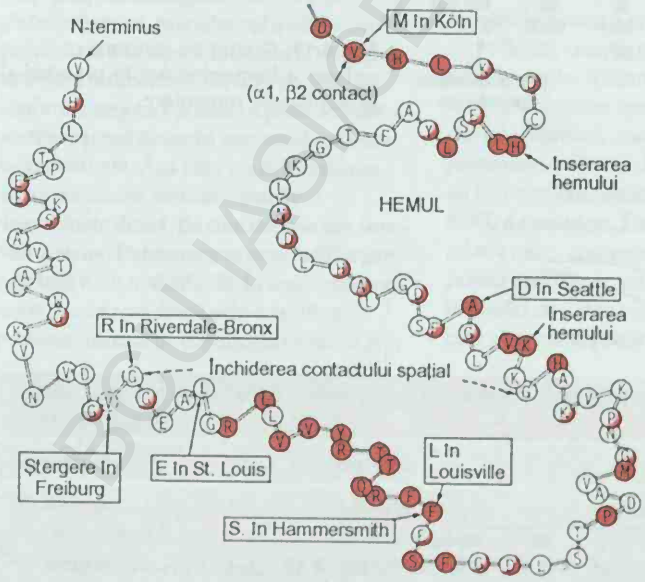


Fig. 4.11. Variația structurii primare a lanțurilor de β-globină din hemoglobina umană.

LEGAREA OXIGENULUI ȘI A DIFOSFOGLICERATULUI

Oxigenul

Oxigenul se leagă de ionul Fe^{2+} aceasta declanșând schimbarea conformației din T în R, precum s-a amintit anterior. Este de remarcat că oxigenul nu se leagă dacă Fe^{2+} este oxidat la Fe^{3+}, cum se găsește în methemoglobină.

Legarea oxigenului de ionul de fier reduce diametrul acestui ion și induce deplasarea sa în planul inelului porfirinic. Oxigenul se leagă într-un loc apropiat de histidina distală

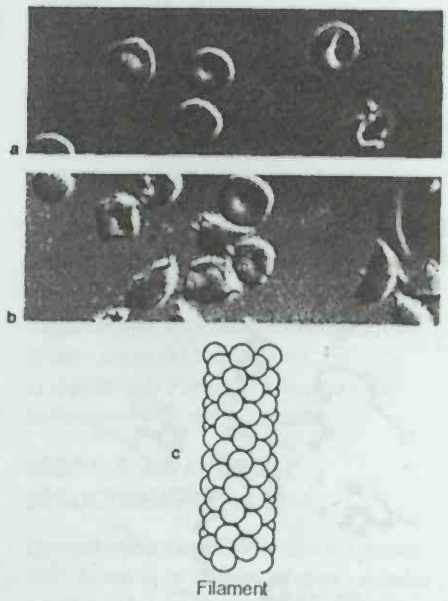


Fig. 4.12. Hemoglobinade tip seceră („sickle-cell") are un efect puternic asupra formei celulelor roșii deoxigenate și cauzează formarea filamentelor proteice.

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

de pe spira E (vezi p. 53) (fig. 4.13). Mişcarea ionului de fier deplasează histidina proximală F8 şi produce o modificare conformaţională în acea subunitate. Aceasta se transmite ulterior şi celorlalte subunităţi.

Difosfogliceratul

Difosfogliceratul (BPG; fig. 4.14), care aşa cum se va vedea joacă un rol fiziologic important, se leagă specific de deoxihemoglobină. El se leagă de cavitatea centrală formată de cele patru subunităţi ale deoxihemoglobinei. La oxigenare, el este eliminat, deoarece această cavitate devine prea mică, dar tinde să reducă afinitatea pentru oxigen.

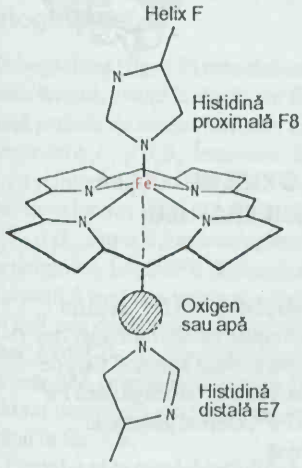


Fig. 4.13. Legătura dintre fierul din inelul porfirinic şi resturile de globină în hemoglobină.

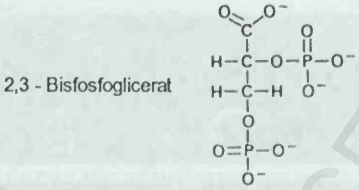


Fig. 4.14 Structura 2,3-difosfogliceratului (BPG).

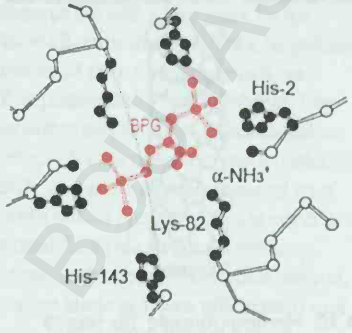


Fig. 4.15. Locul de legare al 2,3-difosfogliceratului (BPG) de deoxihemoglobină.

Aşa precum se arată în fig. 4.15, legarea BPG de deoxihemoglobina umană se face prin interacţiunea BPG cu trei grupe încărcate pozitiv, de fiecare parte a lanţului β.

PROPRIETĂŢILE MIOGLOBINEI ŞI ALE HEMOGLOBINEI

Curbele hiperbolice şi sigmoide

Diferenţele dintre structurile subunităţilor mioglobinei şi ale hemoglobinei se reflectă în curbele lor diferite de saturare cu oxigen, aşa cum se vede şi în fig. 4.16. Curba sigmoidală a hemoglobinei arată că între subunităţile sale proteice există interacţiuni cooperative; afinitatea pentru oxigen devine progresiv mai mare pe măsură ce situsurile oxigenului sunt succesiv ocupate. Aceste fenomene cooperative sunt mai pe larg descrise în capitolul 6.

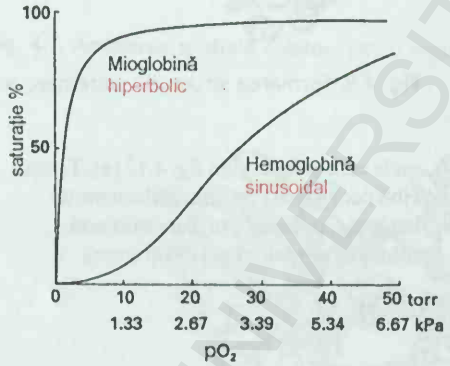


Fig. 4.16. Curbele de saturare cu oxigen ale mioglobinei şi hemoglobinei diferă semnificativ.

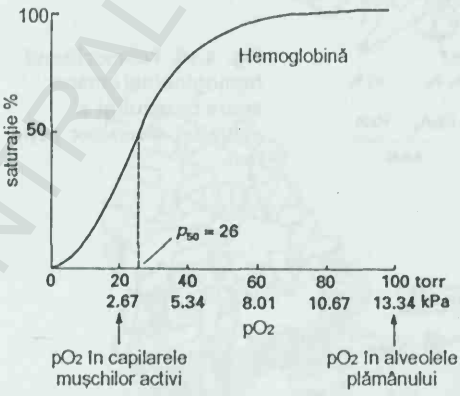


Fig. 4.17. Gradul de saturare cu oxigen a hemoglobinei în plămâni şi în capilarele musculare.

Efectul pO_2

Efectul presiunii parţiale a oxigenului (pO_2) din vasele capilare şi din plămâni, face ca hemoglobina din plămâni să fie efectiv total saturată cu oxigen, în vreme ce în capilarele musculare se pierde peste 50% din acesta. Aceasta este ilustrată şi în fig. 4.17.

Efectul pH-ului

Scăderea pH-ului de la 7,6 la 7,2 provoacă eliberarea oxigenului din oxihemoglobină, cum aşa cum se vede şi din fig. 4.18.

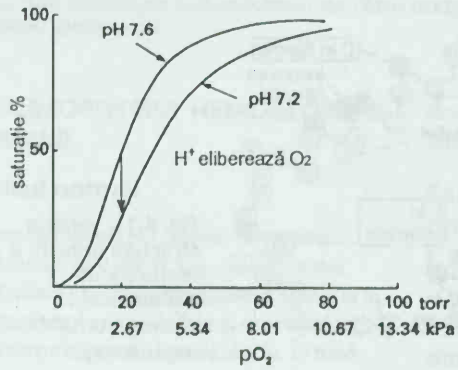


Fig. 4.18. Efectul pH-ului asupra saturării hemoglobinei cu oxigen.

BUCHAREST CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Rolul difosfogliceratului

BPG este prezent în celulele roșii umane. El reduce afinitatea hemoglobinei față de oxigen, ca urmare a legării sale de forma deoxigenată a hemoglobinei și nu de cea oxigenată. Afinitatea BPG față de hemoglobina fetală este mult mai mică comparativ cu cea față de hemoglobina adulților, de aceea oxigenul se va combina preferențial cu hemoglobina fetală. Gradul de reducere a afinității oxigenului față de hemoglobină depinde de raportul BPG/hemoglobină. Aceasta reiese și din fig. 4.19. În măsura în care legarea oxigenului de hemoglobină este asemănată cu interacțiunea unui substrat cu o enzimă, BPG poate fi considerat ca un efector alosteric, așa cum se va explica în capitolul 6 (p. 85).

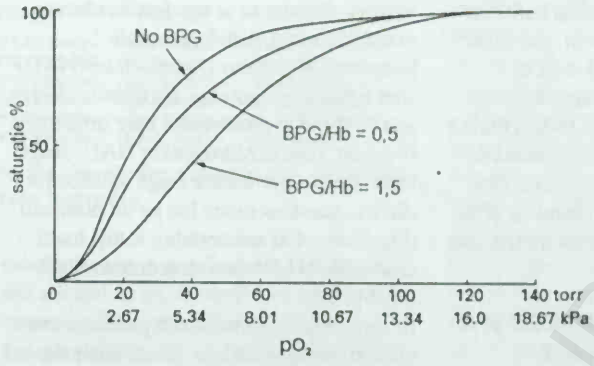


Fig. 4.19. Efectul raportului 2,3-difosfoglicerat/hemoglobină (BPG/Hb) din celulele roșii umane asupra gradului de saturare cu oxigen a hemoglobinei.

Efectul dioxidului de carbon

Dioxidul de carbon (CO_2) are ca efect scăderea cantității de hemoglobină prezentă în forma oxigenată. Efectele CO_2 și ale BPG sunt cumulative, fapt arătat în fig. 4.20.

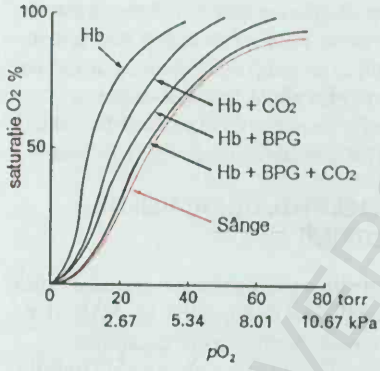


Fig. 4.20. Efectul dioxidului de carbon (CO_2) asupra saturării hemoglobinei cu oxigen și efectul cumulativ al 2,3-difosfogliceratului(BPG).

Unele hemoglobine anormale au o afinitate redusă față de oxigen

În unele cazuri efectul înlocuirilor de aminoacizi poate fi foarte semnificativ, așa cum se vede și din fig. 4.21. În multe alte cazuri însă hemoglobinele anormale și-au mărit afinitatea față de oxigen, fapt arătat și de tabelul 4.1.

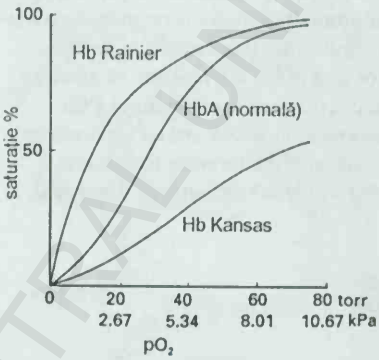


Fig. 4.21. Modificările structurii primare a hemoglobinei (vezi Tabelul 4.1) pot reduce sau mări afinitatea sa față de oxigen.

PRINCIPII GENERALE ALE PLIERII PROTEINELOR

CONCLUZII DERIVATE DIN PRINCIPIILE GENERALE

Odată cu descrierea structurii și proprietăților hemoglobinei – ca o proteină globulară tipică, este adecvat a vedea dacă se pot deduce unele principii generale despre structura proteinelor. Până în prezent s-a confirmat structura primară a peste 500 000 de proteine și noi structuri sunt publicate în mod continuu. Așa cum s-a precizat mai devreme, aceste structuri sunt fie determinate direct, fie sunt deduse din structura genelor. Determinarea structurii terțiare este însă mult mai dificilă. În mod tradițional acest pas se realizează prin cristalizarea proteinei urmată de cristalografierea sa prin raze X. Cu toate că folosirea computerelor a scurtat mult timpul necesar acestei metode, este încă necesar a prepara cristale suficient de perfecte, ceea ce nu este tocmai ușor în toate cazurile. Alături de cristalografia cu raze X, folosirea spectroscopiei RMN s-a dovedit eficientă, mai ales în ceea ce privește proteinele mai mici. În total, până în prezent au fost elucidate structurile terțiare a cca 6 000 de proteine. Datorită acestui număr relativ mic – comparativ cu al structurilor primare rezolvate, au existat numeroase încercări de a crea sisteme computerizate care să permită predicția structurii terțiare pe baza celei primare. Un exemplu pentru dificultatea realizării acestui lucru îl constituie chiar hemoglobina, în care toate moleculele au structuri terțiare foarte similare și există doar câteva resturi invariante de aminoacizi. În plus, până în prezent ne lipsesc o serie de date care să permită explicarea regulilor ce guvernează împachetarea proteinelor, așa încât nu este deloc o surpriză că modelarea computerizată a prezicerii structurii lor terțiare nu s-a dovedit eficientă.

Tabelul 4.1. Unele substituții care provoacă o afinitate crescută pentru oxigen a hemoglobinelor

Hemoglobina	Subsituția	Situsul afectat
Hb Rainier	β-145 (Tyr → Cys)	C-terminal
Hb Denmark Hill	α-95 (Pro → Ala)	Contactul $\alpha\beta_2$
Hb Syracuse	β-143 (His → Pro)	Contactul BPG-β
Hb San Diego	β-109 (Val → Met)	Buzunarul hemului

MODELE COMUNE ALE STRUCTURII TERȚIARE

Compararea structurilor terțiare ale proteinelor în raport cu ordinea relativă a spirelor α și β de-a lungul lanțului polipeptidic a permis gruparea proteinelor. Aceasta este prezentată în fig. 4.22. Se va vedea că unele proteine pot conține preponderent α-helixuri și puține foi pliate β (sau chiar

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

deloc), în vreme ce în altele există multe foi pliate β şi doar puţine α-helixuri, sau deloc. În IgG există două foi pliate β, care se împachetează împreună, dar sunt răsucite. În structurile $\alpha\beta$, spiralele α şi foile β tind să alterneze. Deseori, ramurile β formează o foaie paralelă înconjurată de α helixuri, în vreme ce în alte cazuri există spirale α şi foi β care tind să se separe în regiuni diferite ale lanţului polipeptidic.

IDENTIFICAREA DOMENIILOR ŞI A MOTIVELOR STRUCTURALE

În cazul mioglobinei şi al hemoglobinei, lanţul polipeptidic este înfăşurat într-o structură compactă unică. În proteinele mai mari, având structuri mai mari cu cca 200 de resturi de aminoacizi, există adesea regiuni care formează insule compacte de structuri pliate, de obicei unite prin polipeptide nestructurate.O astfel de structură se găseşte în lizozimul din albuş de ou de găină, prezentat în fig. 4.22; aceste structuri se numesc domenii. Un domeniu reprezintă o polipeptidă sau o parte a unui lanţ care în mod obişnuit poate fi înfăşurat independent sub forma unei structuri terţiare stabile. Motivul structural se defineşte ca o combinaţie a câtorva elemente structurale secundare având o aranjare geometrică specifică. Domeniile sunt alcătuite din motive structurale şabloane. Domeniile şi motivele structurale ale proteinelor sunt adesea asociate cu diversele activităţi parţiale ale unei proteine; aceasta fiind valabilă în special pentru enzime, dintre care se vor descrie câteva exemple. Astfel, dehidrogenazele Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidei (NAD) sunt tipice prin faptul că ele trebuie să lege atât NAD^+ dar şi substratul care urmează a fi oxidat. Alte dehidrogenaze NAD^+ leagă toate NAD^+, dar fiecare leagă un substrat diferit. Acest lucru are loc pe un domeniu diferit de cel al substratului; totuşi toate domeniile NAD^+ au o structură similară (vezi p. 92).

În capitolul 3 a fost descrisă prezenţa exonilor în genele eucariote. Există unele dovezi care arată că exonii sunt coliniari cu polipeptidele din domenii. Aceasta este o idee atractivă prin faptul că ea susţine conceptul că exonii şi domeniile se pot succede aleator în evoluţie, în vreme ce genele proteinelor mai mari se poate să fi evoluat prin juxstapunerea accidentală a exonilor.

CONCEPTUL DE FAMILII DE PROTEINE

S-a menţionat că dehidrogenazele sunt similare structural cu domeniile lor NAD^+. Cu alte cuvinte aceste enzime constituie o familie. În cele mai multe cazuri familiile de proteine au fost identificate prin compararea structurilor lor primare, luând în considerare înlocuirea conservativă a aminoacizilor care ar fi puţin probabil să afecteze în mod serios structura proteinei. Prin această metodă, o secvenţă recunoscută de resturi de aminoacizi poate fi detectată – ceea ce reprezintă un domeniu funcţional, al cărui rol biologic a fost deja identificat. În alte cazuri, familiile au fost propuse pe baza similarităţii structurii lor terţiare dar proteinele posedă mai degrabă o mare varietate de funcţii. Lipocalinele, compuse din proteine care leagă o mare varietate de mici liganzi hidrofobi, sunt o astfel de super-familie; serpinele (*in*hibitorii *p*roteinazelor *ser*ice) sunt un alt exemplu. Structura serpinelor va fi descrisă în continuare. Serpinele sunt o familie de proteine cu importanţă medicală deoarece disfuncţionalitatea lor poate conduce la tulburări de coagulare ale sângelui, emfizem şi ciroză. Doi reprezentanţi de bază ai lor sunt proteinele plasmatice α_1-antitripsina, care inhibă elastaza (vezi pag. 63) şi antitrombina, care este un inhibitor al trombinei, o proteină care alături de alte funcţii activează coagularea sângelui. Structura antitrombinei este prezentată în fig. 4.23. Helixul figurat cu roşu este helixul B; din cele două ramuri β scurte (figurate tot cu roşu) cea superioară este 4B, cea inferioară este 5B, iar ramura lungă verticală este 3A. Secvenţele reale ale aminoacizilor din aceste regiuni sunt prezentate în fig. 4.24, resturile conservate fiind scrise îngroşat.

Se presupune că serpinele s-au dezvoltat printr-o evoluţie divergentă pe durata a circa 500 milioane de ani. Proteina originară ancestrală se presupune că avea funcţia unui inhibitor al proteinazelor serice, dar unii membri ai acestei super-familii acceptaţi astăzi pe baza similarităţii structurii lor şi-au pierdut această funcţie şi şi-au dezvoltat alte

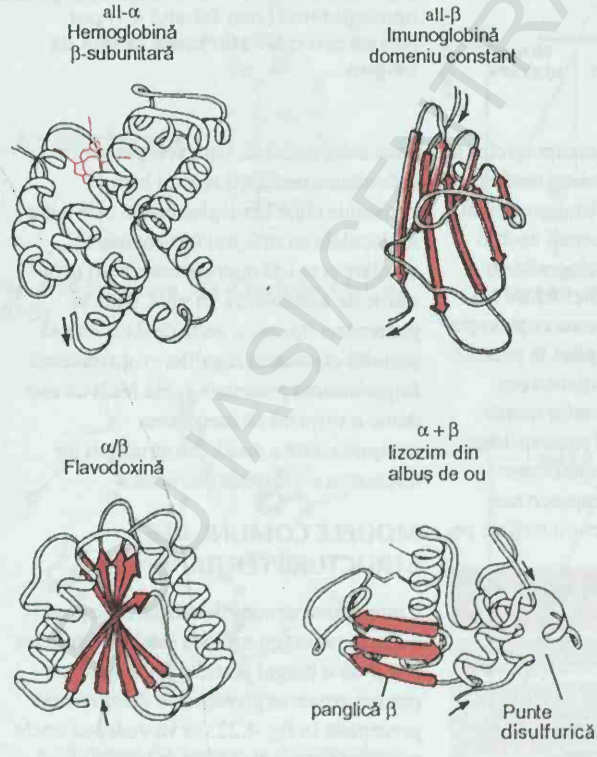


Fig. 4.22. Tipuri de structuri ale proteinelor globulare.

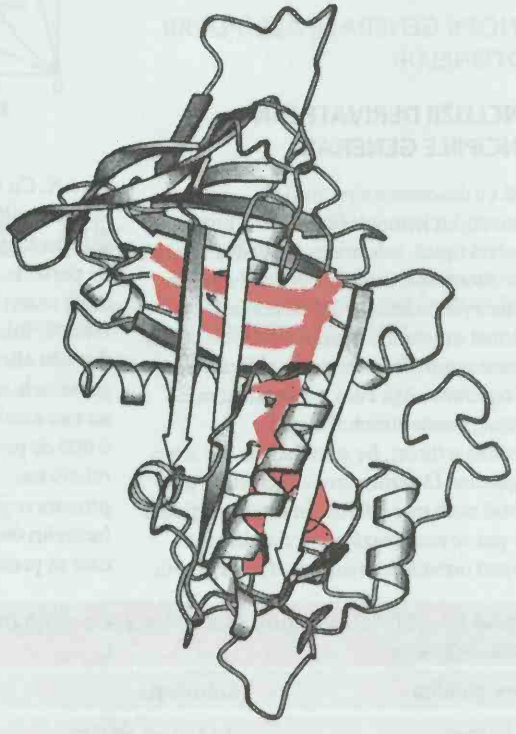


Fig. 4.23. Superfamilii: structura unei serpine tipice, antitrombina. Pentru explicarea lanţurilor marcate cu roşu, vezi textul.

	Helix B	Fila 3A	Fila 4B	Fila 5B
Antitripsină umană	-PVSIATAFAMLSLGT-	-LVNYIFFKGKW-	-KPFVFLMI-	-FMGKVVNPT-
Cofactor II de heparină	-PVGISTAMGMISLGL-	-INLCIYFKGSW-	-RPFLFLIY-	-FMGRVANPS-
Antitrombină	-PLSISTAFAMTKLGA-	-LVNTIYFKGLW-	-RPFLVFIR-	-FMGRVANPC-
Inhibator C1	-PFSIASLLTQVLLGA-	-LVNAIYLSAKW-	-QPFLFVLW-	-FMGRVYDPR-
Inhibator proteinic C	-PVSISMALAMLSLGT-	-LVNYIFFKGTW-	-QPFIIMIF-	-FLARVMNPV-
Corticosteroid BG	-PVSISMALAMLSLGA-	-MVNYIFFKAKW-	-RPFLMFIV-	-FLGKVNRP

Fig. 4.24. Comparaţie între structurile primare ale membrilor superfamiliei serpinelor; resturile care se păstrează sunt figurate cu litere îngroşate.

roluri specifice (de ex. globulina ce se leagă de corticosteroli – corticosteroidul BG , vezi fig. 4.24), sau nu au alte funcţii cunoscute în afara celei nutritive (de exemplu ovalbumina). Alţi reprezentanţi şi-au păstrat această funcţie, inclusiv pe cea de inhibiţie a complementului C1 (primul component al acestuia; vezi pag. 69) şi de inhibiţie a proteinei C (o protează serică din plasma normală, inactivată de trombină şi care clivează factorii de coagulare Va şi VIIIa (vezi pag. 176) la forme inactive). Nu există din păcate reguli sigure şi rapide de clasare a proteinelor în diverse superfamilii; aceasta se face pe baza unui consens general. Serpinele sunt unice în modul lor de acţiune prin faptul că ele implică probabil formarea iniţială a unui complex Michaelis între serpină şi protează, urmată de ruperea (clivarea) complexului inhibitor-protează astfel că serpinele sunt inhibitori sinucigaşi, distruşi tocmai ca rezultat al acţiunii lor inhibitoare.

RELAŢIA DINTRE STRUCTURA ŞI FUNCŢIA PROTEINELOR

Odată ce structura primară a unei proteine a fost determinată, astăzi este obişnuit a se stabili pe baza unei baze de date dacă structura sa primară se aseamănă cu cea a vreunei familii de proteine. Este uneori posibil a se deduce astfel funcţia unei proteine pe această cale. Un astfel de exemplu este proteina identificată din gena răspunzătoare pentru fibroza cistică. S-a explicat în Capitolul 3 (pag. 49) că această genă codifică proteina reglatoare a conductanţei transmembranare care pentru fibroza chistică este o proteină canal clorurat. Presupunerile făcute asupra funcţiei acestei proteine au fost generos susţinute de cercetările ulterioare.

PROTEINELE OMOLOAGE ŞI GENELE ANCESTRALE

După determinarea structurii primare a unei proteine şi detectarea unor similitudini de peste 30% cu alte proteine, se poate trage concluziona că acestea sunt omoloage. Există cercetători care limitează acest termen numai acelor proteine care au dovedit atât prin structura lor primară cât şi prin modul de organizare al genelor lor că sunt derivate prin duplicarea unei gene ancestrale comune. Un exemplu de astfel de proteine omoloage este α-lactalbumina şi lizozimul din albuşul de ou. Ambele sunt implicate în ruperea şi formarea legăturilor β 1,4-glicozidice, dar proprietăţile lor diferă.

Lizozimul este un antibiotic ce apare în mod natural şi este întâlnit efectiv în secreţiile tuturor ţesuturilor. El hidrolizează legătura β-glicozidică dintre C-1 al acidului N-acetilmuramic şi C-4 din N-acetilglucozamină şi prin aceasta distruge peretele celular al bacteriilor. Aşa cum se explică la pag. 181, α-lactalbumina joacă un rol important în formarea lactozei – o diglucidă β 1-4.

Fig. 4.25 prezintă structura primară a lizozimului şi a α-lactalbuminei. Ele sunt izbitor de similare, mai ales în ceea ce priveşte localizarea legăturilor S-S. Numeroase resturi sunt răspunzătoare pentru acţiunea lizozimului, dar Glu-35 şi Asp-52 cu precădere. Proprietăţile de legare ale Ca^{2+} de către α-lactalbumină sunt importante, iar Asp-82, Asp-83, Asp-87 şi Asp-88 joacă un rol esenţial în acest sens. Fig. 4.26 prezintă organizarea genelor pentru α-lactalbumină comparativ cu ale lizozimului din albuşul de ou, pentru câteva specii. Este indicat şi numărul de perechi de baze atât în exoni cât şi în introni. Există o similaritate izbitoare în dimensiunea primilor trei exoni. Diferenţele apărute în dimensiunea exonului 4 se pot aprecia pe baza faptului că acesta conţine mai multe nucleotide netranslatate (vezi pag. 34). Astfel, în cazul lizozimului şi al α-lactalbuminei, atât structurile lor primare cât şi organizarea genelor lor susţin ideea că ele au luat naştere prin duplicarea unei gene ancestrale comune şi sunt de aceea cu adevărat omoloage. În cursul evoluţiei, proprietăţile celor două proteine au devenit însă divergente, α-lactalbumina ajungând să-şi piardă efectiv activitatea enzimatică, iar lizozimul să nu mai joace niciun rol în sinteza lactozei.

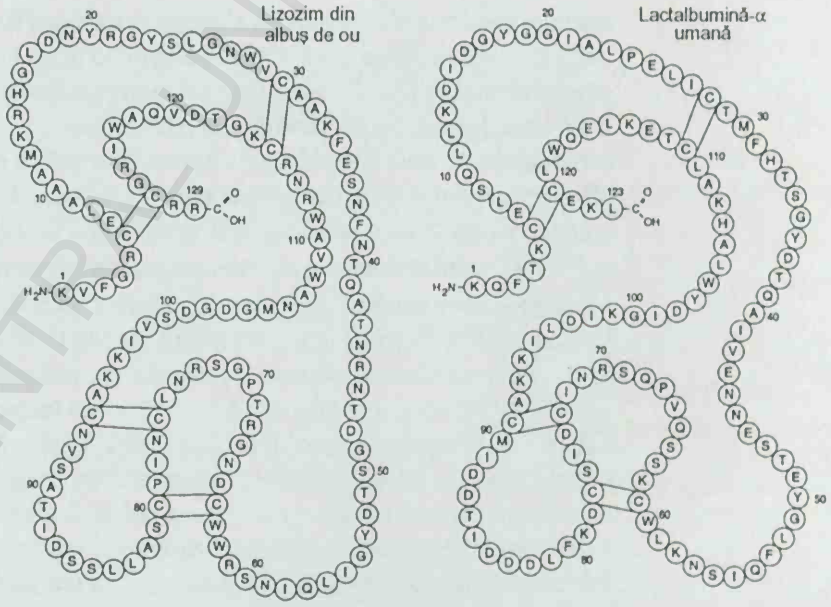
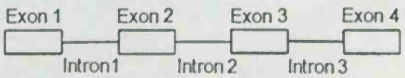


Fig. 4.25. Comparaţie între structura primară a αa-lactalbuminei şi a lizozimului din albuşul de ou: două proteine având o structură primară similară dar activităţi biologice diferite.



Lactalbumină-α umană	159	648	159	489	76	499	333
Lactalbumină-a de porc de Guinea	165	335	159	481	76	507	314
Lactalbumină-a de şobolan	165	341	159	429	76	1016	328
Lisozimă de pui de găină	165	1270	162	1810	79	79	180

Fig. 4.26. Organizarea genelor α-lactalbuminei şi ale lizozimului sunt o dovadă a originii lor comune dintr-o genă ancestrală.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Proteine: funcții specializate

5

În acest capitol, sunt descrise structura și funcțiile unor grupuri de proteine care sunt de interes particular în știința medicală. Proteinele plasmatice sunt relevante în acest sens, iar profilurile electroforetice ale acestor tipuri de proteine sunt folosite în diagnosticare. Albuminele serice sunt cele mai numeroase dintre proteinele serice, structura și rolul lor fiind descris. α_1-Antitripsina joacă un rol important în inhibarea acțiunii elastazei, acest fapt având relevanță în emfizem, în mod particular pentru fumători cu mutații ZZ.

Sunt menționate și aspectele medicale ale hemoglobinei: hemoglobina glicată poate juca un rol în controlul diabeticilor și anemia celulelor seceră („sickle") este rezultatul unor mutații care afectează hemoglobina, aceasta putând fi, de asemenea, diagnosticată prin electroforeză. Proteinele fixatoare de fier sub formă de transferină și feritină sunt descrise în metabolismul fierului. Colagenul este cea mai abundentă proteină din corp care are o structură unică. Sunt descrise structura celor mai comune imunoglobuline, complexele majore de histocompatibilitate (MHC) și receptorii lor. Este făcută o comparație a structurii tuturor acestor proteine în cadrul superfamiliei. Producția anticorpilor policlonali și monoclonali este urmată de o descriere a funcției de complementaritate și a C1q ca proteină complementară tipică. Sunt indicate diferențele dintre imunitatea umorală și mediată celular. Este descrisă folosirea analizei imunologice și a anticorpilor în diagnosticarea cu liganzi radioactivi și prin tehnica ELISA, urmată de folosirea lor în cromatografia de imunoafinitate, cu Western blotting și imunocitochimie. Capitolul se încheie cu o descriere a proteinelor motoarelor moleculare: mușchiul striat și modelul filamentului reglabil al contracției musculare, mușchiul neted și sistemele nemusculare. Ultimele secțiuni includ o descriere a rolului tubulinei, dineinei și kinezinei în citoschelet și deplasarea cromozomilor, cililor și a organitelor.

BCU IULIU HAȚIEGANU UNIVERSITY LIBRARY

PROTEINE PLASMATICE

DEFINIŢII ŞI CONSIDERAŢII GENERALE

Plasma poate fi definită ca fiind un constituent al sângelui independent de elementele structurale, care sunt celule cum ar fi celulele roşii ale sângelui (globulele roşii). Pentru a obţine plasma din sângele proaspăt recoltat, trebuie prevenită coagularea, fie prin adăugarea de compuşi care neutralizează sau înlocuiesc Ca^{2+} cu EDTA (acidul etilendiaminotetraacetic) sau acidul oxalic, care transformă calciul în oxalat de calciu insolubil, fie prin adăugare de heparină (vezi p. 102). Sângele este apoi centrifugat şi plasma e separată prin decantare. Spre deosebire de plasmă, serul este fluidul care este obţinut după ce sângele s-a coagulat şi separat prin centrifugare. Referitor la proteine, principala diferenţă dintre plasmă şi ser este aceea că numai plasma conţine fibrinogen; acesta este înlăturat prin coagulare şi prin urmare este absent în ser.

Proteinele globulare, în special cele din plasmă, au fost clasificate tradiţional în albumine şi globuline. Albumina este solubilă în apă pură, în timp ce globulinele sunt insolubile în apă pură dar sunt solubile în 0,9% NaCl (salin). Globulinele sunt precipitate de obicei cu $(NH_4)_2SO_4$ semisaturat in timp ce albuminele sunt precipitate doar de $(NH_4)_2SO_4$ saturat.

Toate proteinele plasmatice sunt sintetizate în ficat cu excepţia anticorpilor, reprezentaţi de γ-globulină. Acest lucru stă la baza aşa numitor teste de funcţionare a ficatului, în care este determinat raportul dintre albumină (cea mai abundentă dintre proteinele plasmatice) şi γ-globulina (cea mai abundentă dintre globuline). O valoare scăzută a raportului ne indică o funcţionare defectuoasă a ficatului; totuşi, aceasta este oarecum o măsurare brută a funcţionării ficatului, în special când baza metodelor folosite este adesea neclară.

După cum s-a explicat în capitolul 2 (p. 11), proporţiile proteinelor serice pot fi aproximativ determinate prin electroforeză pe hârtie sau gel, reţinând ca fiecare bandă globulinică separată conţine mai multe proteine diferite cu mobilitate electroforetică similară. Se obişnuieşte încă să se supună electroforezei serul pacientului şi mostrele arătate în fig. 5.1 sunt caracteristice. Proteinele majoritare conţinute în diferitele benzi ale globulinelor sunt indicate în tabelul 5.1.

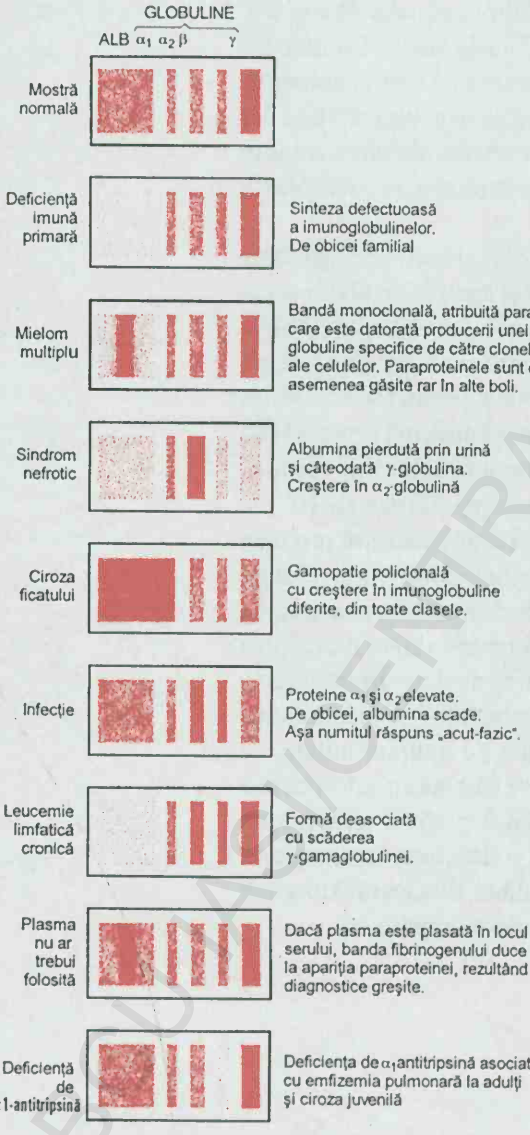


Fig. 5.1. Electroforeza proteinelor serice pe membrană de acetat de celuloză folosind un tampon la pH = 8.6, poate fi folosită pentru a diagnostica anomaliile din serul pacientului. Benzile proteice sunt vizualizate prin colorare cu un colorant. Tabelul 5.1. prezintă principalii constituenţi proteici ai diverselor benzi ale globulinei şi albumina.

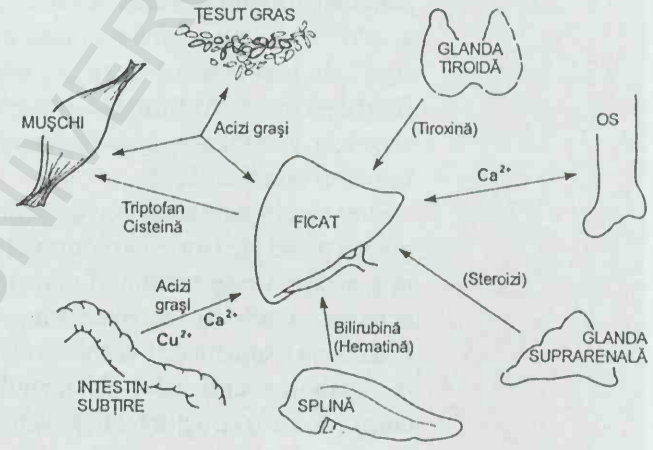


Fig. 5.2. Albumina serică leagă mulţi liganzi. Liganzii în paranteze sunt transportaţi de albumină când transportorii principali sunt ocupaţi.

Tabelul 5.1. Principalii constituenţi ai benzilor globulinei serice separate prin electroforeză

Globulină	Constituenţi reprezentativi
α_1	globulina care leagă tiroxina transcortina glicoproteina lipoproteina antitripsina
α_2	haptoglobulina glicoproteina macroglobulina ceruloplasmina
β	transferina lipoproteina glicoproteina
γ	$\gamma G, \gamma D, \gamma M, \gamma E, \gamma A$

ALBUMINA SERICĂ

Albumina serică este o moleculă unică, cu M_r de 65 000 Da la om, conţinând aproximativ 585 resturi de aminoacid. Este proteina serică în cantitatea cea mai mare, aproximativ 60% la om. Are un rol important în osmolaritatea serului, dar este de asemenea importantă pentru abilitatea ei de a lega multe substanţe diferite, în particular acizi graşi liberi. Proprietăţile ei de legare sunt indicate în fig. 5.2. O substanţă care este legată de un alt compus este cunoscută ca ligand. Abilitatea noastră de a înţelege bazele moleculare ale legării ligandului de către albuminele serice a fost uşurată de elucidarea recentă a structurii terţiare a proteinei. Trăsăturile principale sunt arătate în fig. 5.3., care înfăţişează două aripi foarte similare. Accentuând proprietăţile biologice ale acestei proteine, există o enigmă, pentru că există oameni cărora le lipseşte albumina serică, situaţie cunoscută sub numele de an-albuminemie care totuşi, par să fie normali.

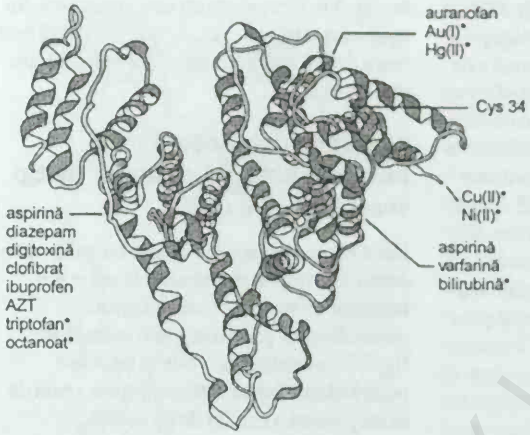


Fig. 5.3. Structura albuminei serice umane. Proteina are M de 65 000; conţine 585 resturi de aminoacizi şi conţine 17 punţi disulfurice, un tiol liber (Cys 34) şi un triptofan. Sunt indicate diferitele locuri de legare ale liganzilor: asteriscul * înseamnă locurile care pot fi deduse, restul au fost determinate prin cristalografie cu raze X. Distribuţia totală, metabolismul şi eficacitatea multor medicamente poate fi alterată bazându-se pe afinitatea lor pentru albumina serică. În câteva cazuri, un medicament renumit este ineficient din cauza afinităţii lui mari pentru această proteină abundentă.

α_1-ANTITRIPSINA

Situaţie normală

Componentul principal al benzii de α_1-globulină (vezi p. 62) din electroforeza proteinelor serice, este proteina numită α_1-antitripsină. Este incorect denumită astfel deoarece este activă mai degrabă faţă de elastază decât faţă de tripsină şi face parte din grupul inhibitorilor serinproteinazei sau serpinelor (vezi p. 58). În ficatul normal, puterea distructivă a elastazei eliberată de neutrofile este ţinută sub control de α_1-antitripsină.

Efectul fumatului şi emfizemul

Fumatul creşte numărul şi activitatea neutrofilelor pulmonare şi, în consecinţă, cantitatea de elastază. În plus, oxidarea cu apă oxigenată scade protecţia oferită de o cantitate dată de α_1-antitripsină circulantă. α_1- Antitripsina este mai puţin activă după oxidare, elastaza cauzând distrugerea ţesutului şi pierderea elasticităţii plămânilor (ex. emfizema). Aceste efecte sunt prezentate pe scurt în fig. 5.4.

Efectul mutantelor

Există două mutante ale α_1- antitripsinei, ambele se limitează la persoane de origine europeană: varianta S în proporţie de 5-8% (genotip MS) şi varianta Z cu 4% (genotip MZ). Specificitatea de ţesut a α_1- antitripsinei depinde de poziţia 358 din lanţul polipeptidic de 394 aminoacizi, poziţie ocupată fie de metionină, fie de valină. Restul de metionină este susceptibil la oxidare, cum am menţionat anterior.

Diferitele efecte ale mutanţilor sunt indicate în fig. 5.5. În cazuri normale, poziţiile critice din lanţ sunt ocupate de glutamat şi metionină sau valină. La nefumători, emfizemul este neobişnuit. Scalele din vârf din fig. 5.5. arata că activitatea elastazei este potrivit controlată de α_1- antitripsină. La fumătorii obişnuiţi, metionina este oxidată şi cantitatea de elastază este crescută. Deşi cantitatea de α_1- antitripsină secretată e normală, ea este mai puţin activă împotriva elastazei. Din acest motiv, fumatul, chiar în limite normale, duce la o tendinţă de emfizem. În mutantul ZZ, glutamatul

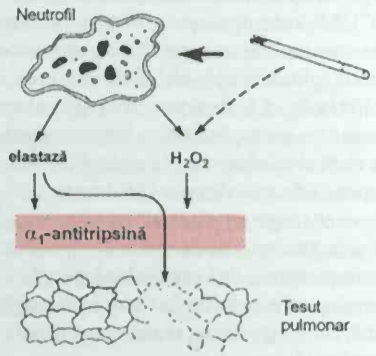


Fig. 5.4. Fumatul creşte cantitatea de elastază şi reduce eficacitatea α_1-antitripsinei.

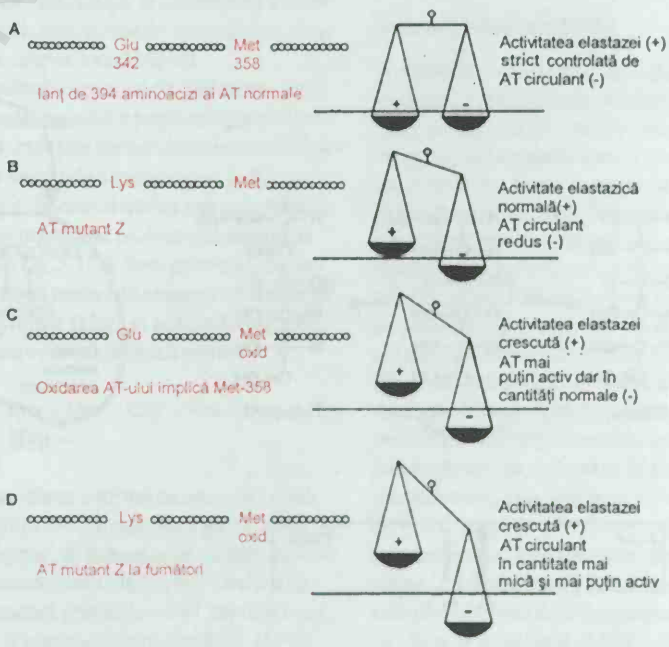


Fig. 5.5. Efectele mutanţilor a - antitripsinei (AT) şi fumatul asupra activităţii elastazei şi cantităţii de a - antitripsină. Linia orizontală indică situaţia la o persoană normală unde activitatea elastazei (stânga) este contrabalansată de cantitatea de α_1-antitripsină (dreapta). Efectul fumatului şi mutaţilor este explicat în text.

este înlocuit de lizină, care rezultă în doar 15% din cantitatea normală a α_1- antitripsinei secretate. α_1- Antitripsina reținută este acumulată în reticulul endoplasmatic al hepatocitelor, unde o mare parte din ea este degradată, dar o parte agrega, formând incluziuni intracelulare insolubile care sunt asociate cu boala de ficat a copilului ZZ. Dacă indivizii ZZ fumează, efectele sunt cumulative; cantitatea de elastază este crescută, α_1- antitripsina este puțină și ceea ce există este puțin activă. Din acest motiv este probabilă apariția emfizemului.

FORMELE HEMOGLOBINEI

Hemoglobina glicată

Glucoza poate reacționa cu resturile de aminoacid N terminal (valină la om) ale lanțurilor β de hemoglobina A (HbA) pentru a produce așa numita HbA_1 „fixată" („rapidă"). Mijlocul de atașare este printr-o reacție neenzimatică de aceea se formează o cetoamină (glucoză-CH_2-NH-βA); cum este arătat în fig. 5.6. Reacția este un proces continuu care are loc încet de-a lungul timpului de viață al celulelor roșii ale sângelui într-o perioadă de aproximativ 120 de zile. Deoarece legătura glucidică nu este aceeași ca și în glicoproteine (vezi p. 180), este de preferat numele de hemoglobină glicată. Fenomenul nu este limitat doar la hemoglobină, fiind raportat un număr mare de alte proteine glicate.

HbA_0 neglicată poate fi separată de HbA_1 fie prin cromatografie pe coloană, fie prin electroforeză pe gel agar, cum se vede în fig. 5.6. Grupele încărcate cu sarcină din agar interacționează cu A_0 într-o măsură mai mare decât cu A_1; aceasta duce la o migrare mai mică a A_0.

Electroforeza lanțurilor de hemoglobină ale celulelor de tip seceră („sickle cells")

Dacă hemoglobina este tratată cu un tampon conținând uree și ditiotreitol la pH = 8,9, lanțurile se separă și pot fi supuse electroforezei pe hârtie. Cum se vede în fig. 5.7., aceasta este o cale folositoare pentru identificarea heterozigoților genei de hemoglobină a celulei de tip seceră.

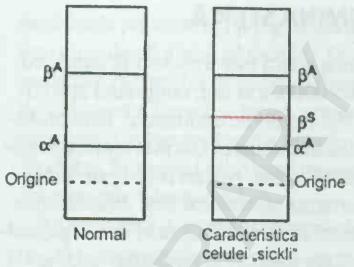


Fig. 5.7. Lanțul b al hemoglobinei celulelor seceră („sickle") poate fi separat de cel b al hemoglobinei normale prin electroforeza.

PROTEINE CARE LEAGĂ FIERUL

Metabolism general

Nu există nici un mecanism de eliminare a fierului ce se acumulează încet în organism în decursul vieții, fiind absorbit în cantități mici din alimentație. Pierderea frecventă de sânge, ca în menstruație, poate cauza anemia dacă alimentația cu fier este inadecvată, deoarece fierul este esențial pentru sinteza hemoglobinei și deci pentru formarea celulelor roșii. Când celulele roșii sunt distruse, fierul este mutat din hemoglobină de către celulele reticuloendoteliale, unde rămâne până când este luat de transferină pentru a fi utilizat în altă parte. Acest metabolism este înfățișat în Fig. 5.8. Dacă cantități excesive de fier sunt absorbite, el poate fi acumulat în celulele reticuloendoteliale, cum sunt celulele Kupffer din ficat; această situație este cunoscută ca și exces de fier sau hemosideroză, datorată depunerilor de hemosiderină, care este o formă de feritină complexată cu alte proteine, și fier. Eliminarea unor cantități de fier prin rinichi poate fi indusă de agentul chelator desferioxiamina, dar pierderea sângelui este singura metodă cu adevărat efectivă de scoatere a fierului din organism. Acidul ascorbic (vitamina C) crește puternic absorbția fierului prin rolul ei în conversia Fe^{3+} alimentar la Fe^{2+}. Fierul este legat la apoferitină în celulele mucoase și Fe^{2+} este transformat in Fe^{3+} in complexul feritinei.

Transferina

Transferina este sintetizată în ficat și este prezentă în banda β-globulinei din proteinele serice (vezi p. 62). Este o glicoproteină cu 2 situri de legare a fierului (ferice). Multe celule posedă receptori transferinici de care depind celulele pentru stocul lor esențial de

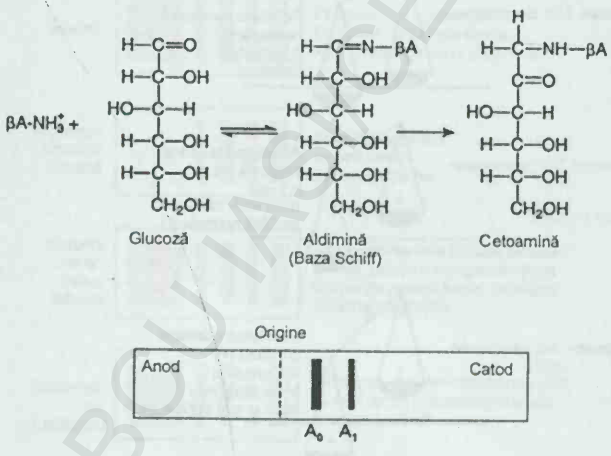


Fig. 5.6. Etape în glicarea proteinelor (sus). Fructozamina este cetoamina produsă și poate fi folosită ca o măsură a avansării reacției. Hemoglobina glicată poate fi separată de cea neglicată prin electroforeză (jos).

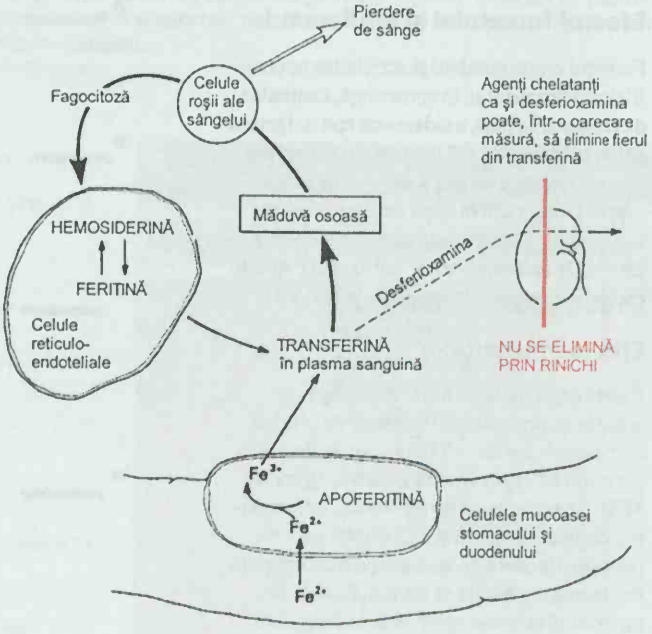


Fig. 5.8. Metabolismul fierului în diverse țesuturi ale corpului după absorbția din intestine.

fier. Transferina este preluată prin endocitoză mediată de receptori (vezi p. 193). În celulele ne-eritroide, preluarea este reglată prin controlul sintezei proteinelor receptoare de către fierul celular care reglează stabilitatea metabolică a ARNm care are elemente sensibile la fier la capătul 3' terminal al moleculei. Celulele roșii ale sângelui au de asemenea, receptori transferinici.

Feritina

Feritina este depozitul de fier în ficat și splină. Apoferitina este forma ce nu conține fier. Feritina catalizează oxidarea Fe^{2+} la Fe^{3+} și conține 24 subunități de combinații diferite de subunități H (178 aminoacizi) și subunități L (171 aminoacizi). Este o proteină foarte mare cu M_r aproximativ de 450 000. Un inveliș subțire de monomeri polipeptidici agregați înconjoară un nucleu anorganic de până la 4500 de atomi de fier. Cu toate că feritina este un depozit pentru fier, principala ei funcție este aceea de mijloc de detoxifiere a fierului. Din acest motiv, nivelul ei în ficat și splină, care este controlat la nivelul traducerii, depinde de cantitatea de fier de depozitat. O parte din feritină cu un conținut scăzut de fier circulă în plasmă.

COLAGENUL

Colagenul este cea mai abundentă proteină în mamifere și este elementul fibros principal al pielii, osului, tendonului, cartilajului, vaselor sangvine și dinților. Fig. 5.9. prezintă structura microfibrilei cu aranjare alternantă grupată a moleculelor de tropocolagen. Există un spațiu liber între terminațiile moleculelor. Microfibrilele sunt asociate într-o fibrilă iar câteva fibrile formează o fibră de colagen.

Pentru a-și îndeplini multiplele sale roluri, structura de bază a colagenului variază, incluzând 13 tipuri diferite, care toate conțin

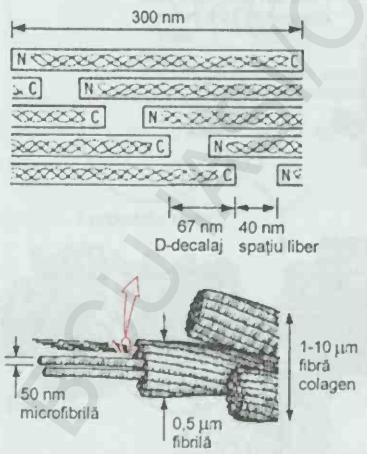


Fig. 5.9. Microfibrilele conțin molecule de tropocolagen cu aranjare alternantă grupată.

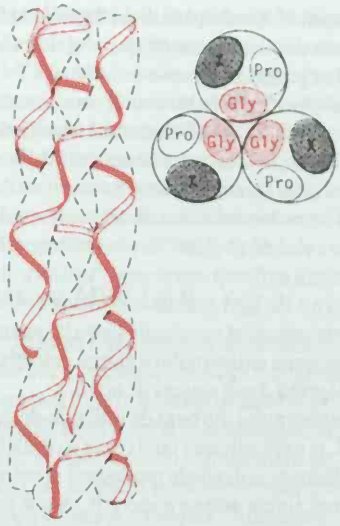


Fig. 5. 10. Modelul tropocolagenului triplu-catenar. La dreapta este o secțiune transversală arătând limita fiecărei catene și poziția glicinei.

3 lanțuri polipeptidice de aproximativ 1000 aminoacizi, fiecare în conformație helicoidală de stânga. Acest lucru este arătat în fig. 5.10., care este un model al tropocolagenului triplu catenar. Catenele sunt răsucite una în jurul celeilalte și formează un superhelix de dreapta. În plus, există legături transversale covalente implicând aldehide provenite de la lanțurile laterale ale lizinei; aceste legături pot fi fie în fie între lanțuri. Colagenul din animalele tinere nu prezintă aceste legături transversale și este deci tropocolagen. În funcție de compoziția în aminoacizi a celor trei lanțuri, moleculele de colagen sunt clasificate în câteva zeci de tipuri.

În contrast cu proteinele globulare, secvența de aminoacizi a tropocolagenului este regulată, excepție făcând aproximativ ultimele 20 de resturi de aminoacid de la fiecare terminație; fiecare al treilea rest este glicina, de obicei urmată de prolină (de asemenea arătată în fig. 5.10.). Sunt prezente, de asemenea, două resturi de aminoacizi neuzuali: hidroxiprolina (Hyp) și hidroxilizina. Din acest motiv secvența tipică poate fi:

– Gly – Pro – Met – Gly – Pro – Arg – Gly – Leu – Hyp –

Fiecare dintre cele trei catene este legată prin legături de hidrogen la celelalte două; nu există legături de hidrogen intracatenare, care sunt caracteristice α-helixului. Donorii de hidrogen sunt grupările – NH peptidice ale glicinei și acceptorii sunt grupările –C=O peptidice ale resturilor din alte lanțuri. Astfel, direcția legăturilor de hidrogen este transversală față de axa longitudinală a fibrei de tropocolagen.

SISTEMUL IMUNITAR ȘI IMUNOGLOBULINELE

NOȚIUNI GENERALE

Sistemul imunitar protejează corpul împotriva invaziei de alte tipuri de macromolecule, în special proteine și polizaharide, dar nu direct asupra moleculelor mici, deși acestea pot declanșa un răspuns imun dacă sunt legate la o proteină din corp. Corpul are două tipuri de răspunsuri imune: (1) dacă răspunsul la un imunogen este producerea de anticorpi solubili în fluidele corpului, se numește imunitate umorală (fluidele corpului de mai pot numi umori); (2) dacă răspunsul este prin celule citotoxice sau mortale, atunci imunitatea este cunoscută ca mediată celular. Aceste două mecanisme se completează reciproc.

Provocarea pentru sistemul imunitar este capacitatea de a furniza anticorpi care să interacționeze cu antigenele care apar ca rezultat al prezenței imunogenului sau a celulelor străine (cunoscute ca „non-self") care invadează corpul, dar să nu reacționeze în acest fel față de proteinele proprii ale corpului (cunoscute ca „self"). Acest subiect a fost pe scurt prezentat în capitolul 3 (p. 38), unde producerea celor două forme de IgM a fost descrisă ca un exemplu de combinare alternativă „cap la cap" și a fost descrisă diversitatea de generații de anticorpi. Nu este potrivit în acest text să considerăm toate aspectele imunității, dar urmează o descriere a proteinelor care joacă roluri importante în cele două tipuri de imunitate.

Imunitatea umorală

Anticorpii sunt produși de o clasă de limfocite numită celule plasmatice, care se dezvoltă când limfocitele B, care sunt originare din măduva osoasă (litera B provine de la „Bone"), sunt stimulate de prezența unui antigen. În timp ce un imunogen este o substanță care cauzează producerea de către corp a anticorpului, un antigen este o substanță, cum ar fi un motiv de proteină, cunoscut va epitop, care cauzează formarea de anticorpi specifici. Fig. 5.11. arată stadiile acestei transformări. Antigenul leagă o celulă pură B, unde întâlnește anticorpul specific în formă de imunoglobulină, IgM care, în forma lui monomerică, este distribuit pe suprafața celulară, cum s-a descris anterior (p. 38). Antigenul este degradat la peptide și intră clivat sub forma unei glicoproteine, complexul major de histocompatiobilitate de clasa II principală (MHC). Moleculele MHC sunt exprimate în celulele tuturor vertebratelor superioare, fiind găsite pentru prima dată în șoareci. La oameni, ele sunt numite antigeni HLA (leucocite asociate

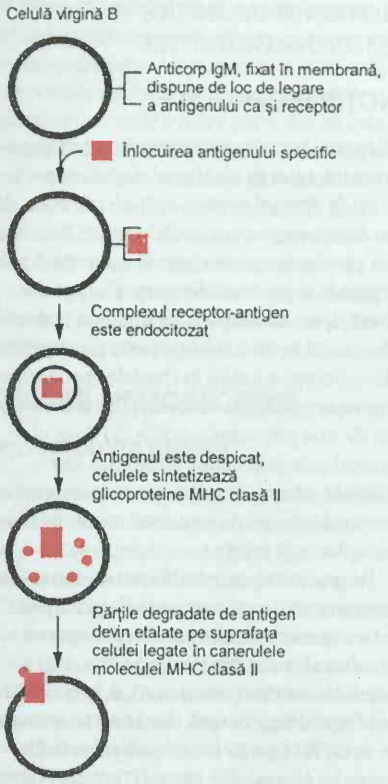


Fig. 5.11. Paşii conversiei celulei B pure la o stare activată, pregătită pentru conversia la o celulă plasmatică producătoare de anticorp.

umane). Aceste părţi degradate din antigen sunt dispuse pe suprafaţa celulelor. Celula B se leagă apoi la celula ajutătoare T („helper") (T de la timus), care posedă proteina CD4 (CD înseamnă cluster de diferenţiere) şi care este activată de acelaşi antigen. Când se întâmplă acest lucru, celula B se multiplică, datorită eliberării citokinelor de celulele „helper" T, şi se maturează într-o celulă anticorp secretoare. Anticorpul este în formă de IgM pentameric. Acest fenomen este cunoscut ca selecţie clonală, pentru că prezenţa anticorpului a cauzat selecţia, mai degrabă decât sinteza de novo, a anticorpului din baza de miliarde de celule B, şi multiplicarea unei clone a celulelor plasmatice devotate producerii şi secreţiei unui singur anticorp specific. Acest lucru este cunoscut ca răspunsul imun dobândit şi este înfăţişat în fig. 5.12. De asemenea, justifică faptul că răspunsul secundar la prezenţa antigenului este mult mai viguros decât primul, clonele limfocitelor rămase de la primul răspuns sunt încă prezente în timpul celei de-a doua provocări. Ele contribuie la memoria imunologică.

Imunitatea celular-mediată

Celulele citotoxice sau celule letale T (care conţin proteina CD8) sunt responsabile de imunitatea mediată celular, care conduce la înlăturarea virusului atacator. Proteina din virusul infecţios este procesată în fragmente care se combină cu MHC clasa I şi sunt aduse la suprafaţa proteinei de catre MHC. Acolo complexul este detectat de celulele letale T care exprimă proteina CD8. Apoi celulele T secretă compuşii care distrug celulele infectate. Aceste evenimente sunt ilustrate în fig. 5.13.

STRUCTURA PRINCIPALELOR PROTEINE IMPLICATE ÎN RĂSPUNSUL IMUN

Imunoglobulinele

Există mai multe clase diferite de imunoglobuline, dar toate au o arhitectură comună care se regăseşte, de asemenea, printre membrii aşa numitei superfamilii de receptori imunoglobulinici.
Structura IgG este arătată în fig. 5.14. Este proteina care se produce cele mai mari cantităţi în urma stimulării prelungite. Ea are două lanţuri grele identice (H) şi două identice uşoare (L) legate între ele prin legături S-S. Antigenul interacţionează cu regiunile hipervariabile ale lanţurilor. Variabilitatea se referă la structura primară care produce o structură terţiară care se leagă în mod unic de fiecare antigen. Regiunile constante sunt implicate în legarea complementului, care va

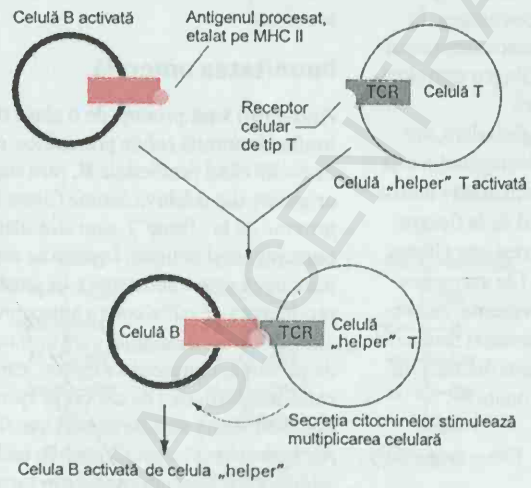


Fig. 5.12. Celula „helper" T activează o celulă B pentru a deveni o clonă a celulelor plasmatice secretoare de anticorpi. TCR = receptor celular T.

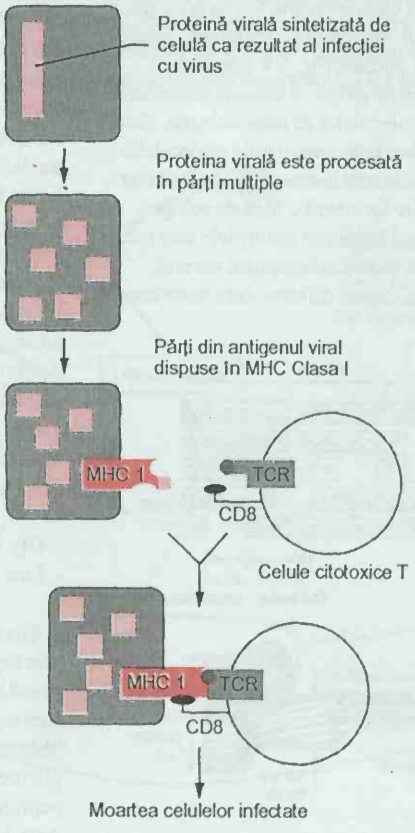


Fig. 5.13. Secvenţa evenimentelor din reacţia imunitară mediată celular cu un antigen străin care a fost sintetizat în interiorul celulei.

BUJ ASICENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

fi descris mai târziu. Structura se divide în domeniul de legare a antigenului Fab şi în domeniul de legare al complementului Fc. Molecula este clivată de papaină care furnizează o polipeptidă cristalizabilă care este de importantă pentru determinarea structurală. Structura tridimensională a IgG este arătată în fig. 5.15. Structura este flexibilă, de aceea aranjamentul relativ al domeniilor se poate schimba. Fig. 5.16. rezumă locurile de deplasare. Există două regiuni implicate în aceste schimbări: regiunea „balama" la joncţiunea C_H1 şi C_H2 şi regiunea „comutatoare" la joncţiunea dintre domeniile V şi C în Fab.

Structura IgM şi IgA

Primul răspuns la un antigen este sub formă de IgM, după cum s-a descris anterior (fig. 3.62, p. 38). IgM este un pentamer, structură care se poate vedea în fig. 5.17. În IgM, regiunea balama din IgG este înlocuită cu o pereche de extradomenii rigide (C_H2), în timp ce domeniile C_H3 şi C_H4 in IgM sunt echivalente structural cu regiunile C_H2 şi C_H3 respectiv, in IgG. IgM conţine de asemenea lanţul J, care este o polipeptidă cu M_r 15.000, bogată în cisteină. Lanţul J leagă două lanţuri grele, astfel permiţând formarea punţilor S-S dintre domeniile C_H3 şi C_H4 ale altor monomeri, formând astfel un pentamer. Similar, lanţul J este prezent în IgA. Fiecare moleculă de IgG are valenţa 2; adică, are potenţialul de a se combina cu două molecule de antigen (teoretic deci, IgM are valenţa 10, dar valenţa efectivă este în jur de 5).

Structura MHC I şi II

Fig. 5.18 arată reprezentarea schematică a structurilor. Proteinele din clasa I se compun dintr-un lanţ lung α legat necovalent la o polipeptidă mică numită β_2-microglobulină. Lanţul α are trei domenii extracelulare (α_1, α_2 şi α_3), un segment transmembranar şi o porţiune terminală citosolică. Diferenţele dintre proteinele de clasa I sunt localizate în principal în domeniile α_1 şi α_2, care formează locul de legare a peptidelor. Domeniul α_3, care interacţionează cu o β_2-microglobulină constantă, este bine conservat. Planul general al moleculei MHC de clasa II este similar. Locul de legare a peptidei este format din domeniile α şi β.

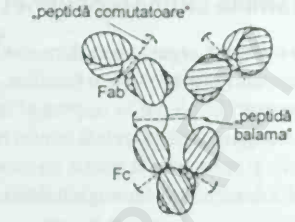


Fig. 5.16. Locurile de deplasare a IgG. Vezi explicaţiile din text.

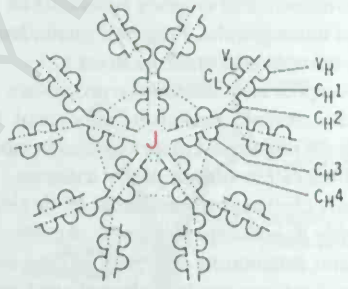


Fig. 5.17. Structura IgM. Formarea polimerului IgM depinde de prezenţa lanţului J.

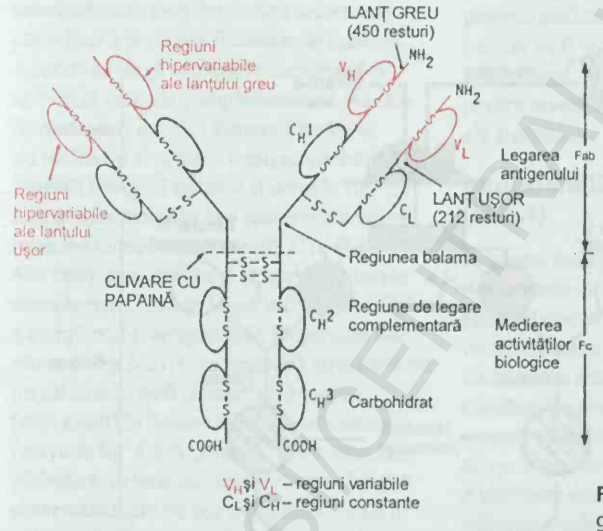


Fig. 5.14. Structura imunoglobulinei IgG.

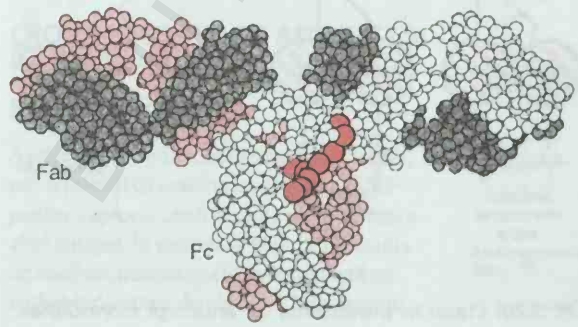


Fig. 5.15. Reprezentarea spaţială („space-filling") a structurii tridimensionale a IgG Dob umane (Dob este crioglobulina IgG (k) umană). Dob are 15 resturi suprimate în regiunea balama comparativ cu IgG normală. Cele două lanţuri grele sunt arătate în alb şi roz. Lanţurile uşoare sunt gri. Carbohidratul este reprezentat ca sfere roşii.

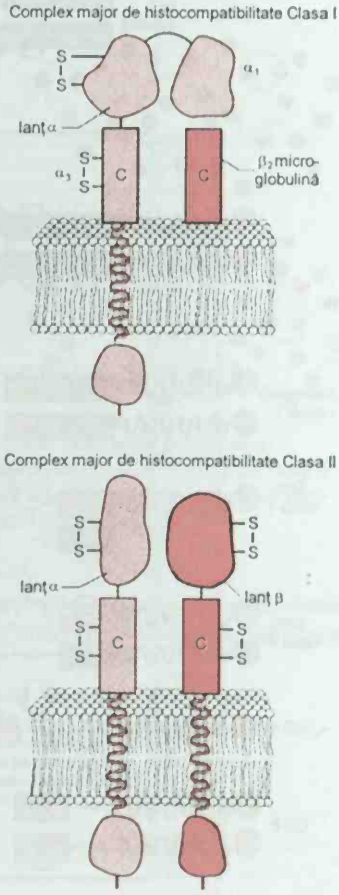


Fig. 5.18. Reprezentarea schematică a organizării domeniilor MHC clasa I şi II.

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITY LIBRARY IAŞI

Superfamilia imunoglobulinei

Fig. 5.19 compară organizarea domeniului câtorva membri proeminenți ai familiei. Mulți receptori implicați în răspunsul imun și în recunoașterea celulă-celulă conțin regiuni variabile și constante în relație cu secvența și structura domeniilor imunoglobulinei.

PRODUCEREA DE ANTICORPI

Anticorpi policlonali

Anticorpii policlonali rezultă din administrarea unei proteine sau polizaharide la un animal dintr-o specie neînrudită cu sursa imunogenului. Progresul imunizării este măsurat prin prezența în ser a anticorpilor care determină o precipitare când acesta este incubat cu imunogenul. O proteină imunogenă mare vor avea în mod obișnuit câteva situsuri pentru antigene, fiecare dând naștere unui anticorp; de aici numele de anticorpi policlonali. Aceste situsuri sunt numite epitopuri. În timp ce fiecare anticorp are două situsuri combinate, interacțiunea dintre antigene și anticorpi justifică existența precipitatului, așa numita reacție a precipitinei. Un exces de imunogen determină redizolvarea precipitatului.

Anticorpi monoclonali

În contrast cu anticorpii policlonali, un anticorp monoclonal reacționează numai cu un singur epitop; din acest motiv nu apare precipitare când anticorpul și antigenul sunt incubați. Producerea de anticorpi monoclonali a devenit o tehnică foarte importantă și va fi descrisă în continuare. În exemplul arătat în fig. 5.20, au fost imunizați șoareci cu un imunogen purtând doi epitropi a și b. Celulele splinei produc anti-a și anti-b, care apar ca anticorpi serici. Splina este îndepărtată și celulele individuale fuzionate în polietilenglicol cu celule tumorale de tip B având diviziuni constante, selectate pentru deficiența lor în enzimă purinică (vezi mai jos). Celulele care rezultă sunt distribuite în plăcuțe cu godeuri și mediu HAT (hipoxantină-aminopterină-timidină) care va omorî toate celulele în afara celor fuzionate. O diluție ulterioară a mediului asigură că fiecare godeu va conține o celulă de tip hibridoma sau deloc. Fiecare hibridoma, care este un produs de fuziune a unei celule care formează un singur anticorp cu o celulă tumorală, va avea capacitatea primei de a secreta o singură specie de anticorp și imortalitatea celei de-a doua, permițându-i să prolifereze continuu, cu progenitor clonal ce furnizează o rezervă continuă de anticorp monospecific – anticorpul monoclonal.

Celulei mutante îi lipsește activitatea hipoxantin-guanin fosforiboziltransferazică (HGPRT). Această enzimă catalizează sinteza inozinatului (un precursor al AMP-ului și GMP-ului) în calea „de salvare" („salvage") (vezi p. 26). În mediu HAT aminopterina blochează sinteza *de novo* a nucleotidelor. Hipoxantina nu poate fi folosită de celulele mielom nefuzionate pentru că acestora le lipsește HGPRT. Celulele splinei conțin HGPRT, dar ele nu sunt imortale. Celulele de tip hibridoma supraviețuiesc deoarece ele sunt și imortale și conțin și HGPRT provenit de la celulele splinei.

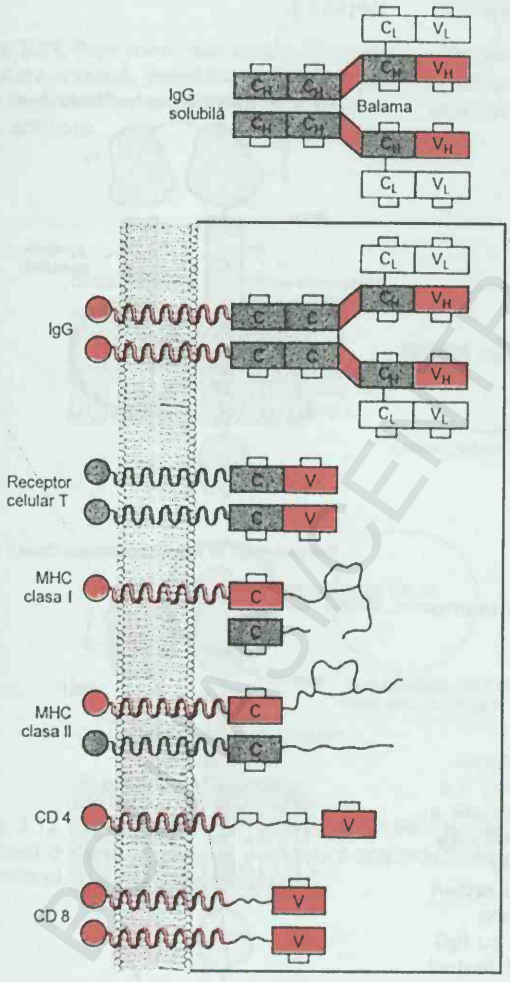


Fig. 5.19. Similarități în organizarea domeniilor unor membri importanți ai superfamiliei imunoglobulinei.

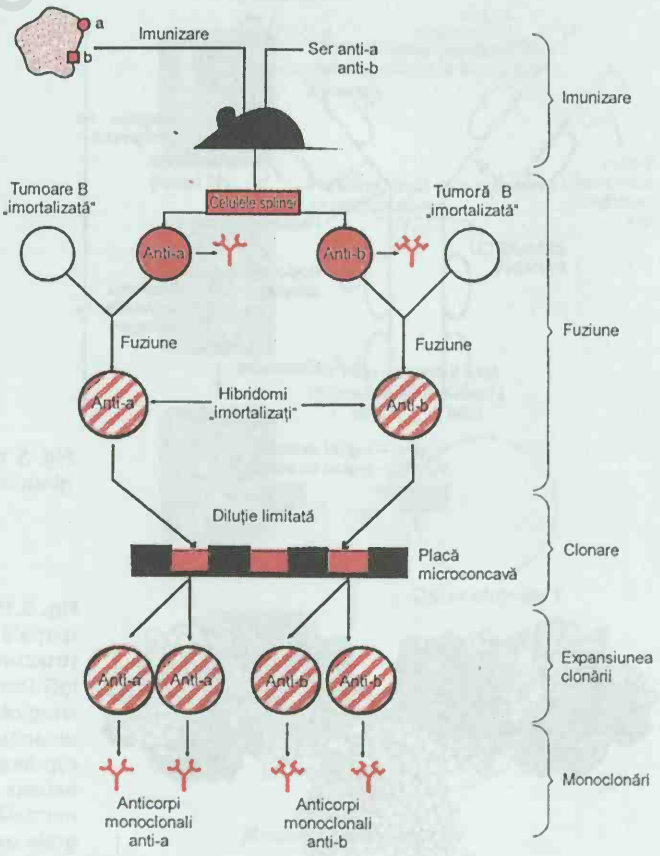


Fig. 5.20. Etape în producerea de anticorpi monoclonali.

COMPLEMENTUL

Ca o completare la sistemul imunitar adaptativ, care a fost descris anterior, corpul are un sistem imunitar înnăscut, în sensul că are abilitatea de a recunoaşte imediat anumiţi microbi şi să-i distrugă. O componentă importantă a răspunsului înnăscut este clasa de proteine ale sângelui, cunoscută ca complement, numele venind de la capacitatea lor de a asista sau a „complementa" activitatea anticorpilor în lupta cu infecţia.

Complementul implică o serie complexă de 20 de proteine care, alături de coagularea sângelui, fibrinoliza şi formarea de kinine, formează unul dintre cele mai precise sisteme enzimatice inductoare – în acest sens o serie de proteaze- care se găsesc în plasmă. Aceste sisteme produc în mod caracteristic un răspuns rapid, cu amplificare înaltă la stimuli induşi mediaţi de un fenomen de cascadă unde produsul unei reacţii funcţionează ca enzimă ce catalizează următorul proces.

Complementul poate fi îndus în 3 moduri. Un tip de moleculă complement, numită C_3, se poate lega la orice proteină, cum ar fi cele din bacterii, şi apoi determină legarea altor molecule complement. Altă cale este specifică macrofagului care secretă interleukina 6, care determină secreţia de către ficat a proteinei fixatoare de manoză; Aceasta se leagă la capsula bacteriană şi activează cascada complementului. Aceste două moduri implică sistemul înnăscut.

Al treilea tip al acţiunii complementului implică sistemul adaptiv, ilustrat în fig. 5.21. Legarea anticorpilor la o bacterie activează proteina complement numită C1q (M_r 400 000), care activează celelalte molecule complement. C1q se leagă la domeniul C_H2 a complexului antigen IgG. După cum s-a văzut în fig. 5.21, C1q seamănă structural cu un mănunchi de 6 „lalele" cu 3 lanţuri (subunităţi) în fiecare lalea. În subunitate (arătat în fig. 5.22) „floarea" are o structură globulară, în timp ce „tulpina" este alungită şi asemănătoare cu cea triplu helicoidală a colagenului (vezi p. 65). Aceasta conţine secvenţa triplet gly-X-Y cu hidroxiprolină. Rezultatul cascadei acţiunii protezelor este distrugerea prin liză a bacteriilor.

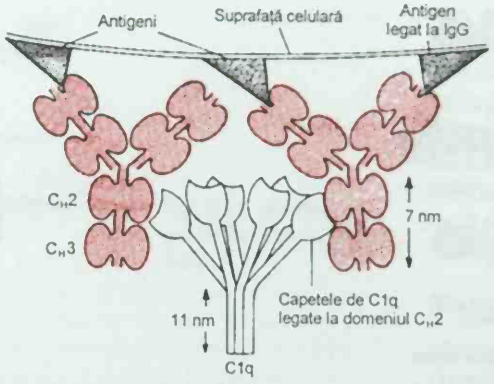


Fig. 5.21. Sistemul adaptativ al complementului. Acesta este iniţiat de legarea anticorpului la bacterii care activează proteina complement C1q cu structura arătată.

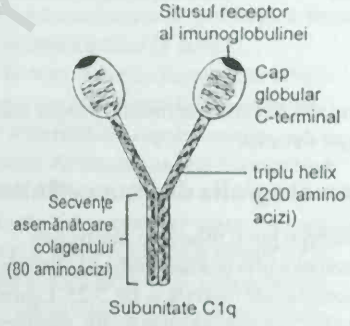


Fig. 5.22. Structura „tulpinii" C1q.

CROMATOGRAFIA DE AFINITATE ŞI IMUNOANALIZA

Radioimunoanaliza

Anticorpii, fie policlonali sau monoclonali, pot fi folosiţi ca reactivi analitici specifici pentru a aprecia cantitatea de proteină sau a altui antigen. În metoda originală, substanţa de analizat, numită analit, este marcată cu izotop radioactiv, de obicei ^{125}I. Principiul radioimunoanalizei este arătat în fig. 5.23. În primul rând, o cantitate limitată şi constantă de anticorp este incubată cu un analit radioactiv de concentraţie constantă cum ar fi, de exemplu, 40-50% din analitul marcat, care este legat de anticorpul (A). Când se adaugă un analit nemarcat la soluţie sau extractul de analizat, are loc o competiţie între analitul marcat şi cel marcat pentru limitarea concentraţiei situsurilor de legare pe anticorpul (B). Cantitatea de analit marcat rămas legat de anticorp poate fi măsurată după separarea fracţiilor legate şi nelegate ale anticorpului. Când nu există concurenţă cu un analit nemarcat, cantitatea de analit marcat legat va fi mai mare. Când este prezent analitul concurent, mai puţin analit marcat va fi legat de anticorp. Prin analize matematice, pot fi obţinute cantităţi precise pentru nivele de concentraţii foarte scăzute ale analitului.

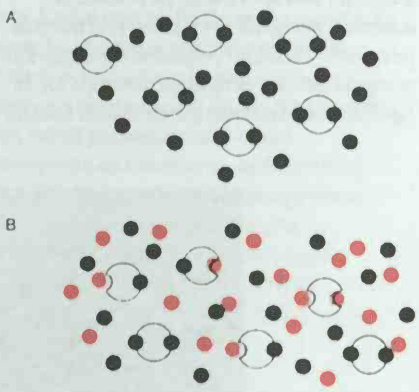


Fig. 5.23. Ilustrarea principiilor radioimunoanalizei. Cercurile negre indică analitul marcat, cercurile roşii analitul nemarcat.

Imunoanaliza cu enzime legate (ELISA)

În scopul înlăturării dezavantajelor determinate de folosirea radioactivităţii, enzimele pot fi ataşate la analit şi folosite în locul analitului radioactiv. Principiul metodei ELISA este arătat în fig. 5.24. Estimarea cantitativă a reacţiilor enzimatice arată câtă enzimă a fost înlocuită, aceasta fiind corelată cu cantitatea de analit din soluţia analizată. Activitatea enzimatică este măsurată prin adăugarea substratului la enzimă. Deseori, o dehidrogenază cum ar fi glucozo-6-fosfatdehidrogenaza, care necesită NAD^+ este folosită în aşa fel încât reacţia să poată fi analizată prin spectrofotometrie. O altă enzimă folositoare este xantinpe-

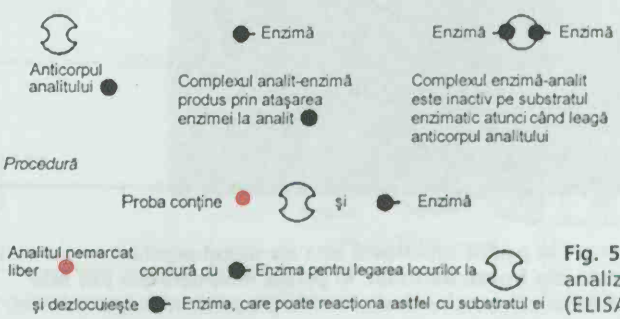
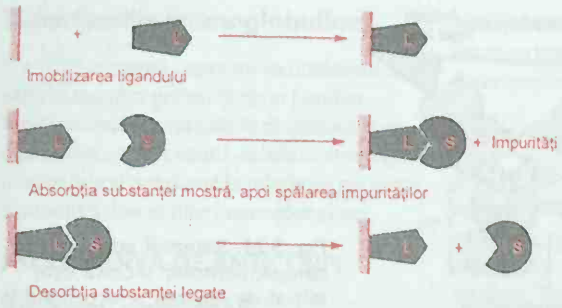


Fig. 5.24. Principiile imunoanalizei cu enzime legate (ELISA).



Enzime:	Substrat analog, inhibator, cofactor
Anticorpi:	Antigen, virus, celulă
Lectină:	Poliglucid, glicoproteină, receptor celular de suprafață, celulă
Acizi Nucleici:	Secvențe de baze complementare, histone, polimeraza acidului nucleic, proteină de legătură
Hormoni, vitamine:	Receptor, proteină de transport
Celulă:	Proteină specifică de suprafață celulară, lectină

Fig. 5.25. Ilustrarea principiului cromatografiei de imunoafinitate.

roxidaza, deoarece peroxidul produs poate fi ușor detectat.

Cromatografia de imunoafinitate

Anticorpii pot fi folosiți în purificarea proteinelor prin cromatografia de afinitate. Procedura este ilustrată în fig. 5.25. Ligandul specific, în acest caz un anticorp, este legat covalent la matricea coloanei, care este de obicei un dextran, ca de exemplu Sepharoza. Substanțele ce se leagă de ligand, în acest caz antigenii, sunt apoi trecuți pe coloană și adsorbiți. Antigenii pot fi eluați prin trecerea pe coloană de soluții conținând săruri sau alți compuși care vor determina desorbția lor. În fig. 5.25 sunt date exemple de liganzi folosiți.

„Western blotting"

Este numită astfel datorită asemănării cu „Southern blotting" (vezi p. 47). Este o metodă de detectare a proteinelor care reacționează cu un anticorp specific. Proteinele anticorp reactive dintr-un amestec sunt analizate printr-o primă separare a proteinelor prin gel electroforeză denaturantă bidimensională.
Gelul este apoi pus în contact cu o folie de nitroceluloză în prezența curentului electric. După tratamentul nitrocelulozei cu anticorp, reacțiile antigen-anticorp pot fi vizualizate fie cu ajutorul folosirii anticorpului marcat ^{125}I sau prin tehnica ELISA. Un exemplu este arătat în fig. 5.26.

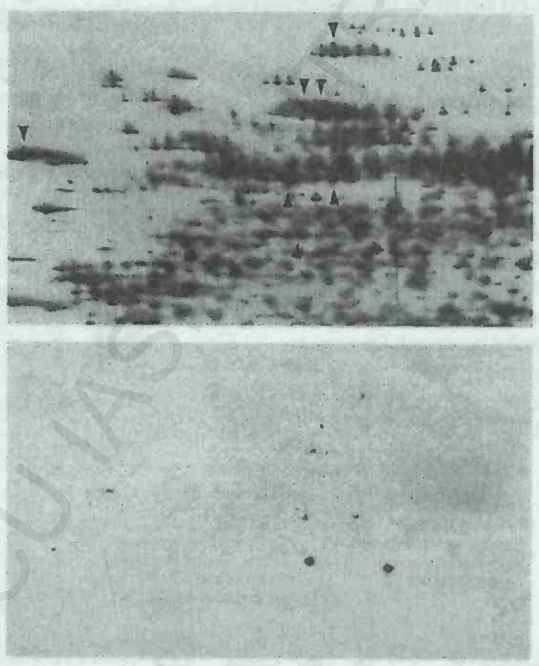


Fig. 5.26. „Western blotting". În partea superioară este rezultatul separării în gel bidimensional a proteinei totale din frunze de tutun. În partea inferioară (de jos) este același gel conținând anticorpii cu proteine fosforilate la treonină în timpul mitozei.

Imunocitochimia

Sunt folosite in prezent multe tehnici pentru a localiza antigenele particulare în preparate citologice. Anticorpul este în prima fază conjugat cu un colorant fluorescent cum ar fi fluoresceina. O secțiune fină de țesut este apoi imersat într-o soluție cu anticorp marcat și după tratament, anticorpul legat poate fi vizualizat prin microscopie de fluorescență. În alte cazuri, anticorpul este legat la feritină și localizat prin microscopie electronică.

PROTEINELE MOTOARELOR MOLECULARE

INTRODUCERE

Mișcarea coordonată, care este esențială pentru viață este condusă de motoarele moleculare. Pot fi identificate trei sisteme în care diferite proteine joacă un rol critic: (1) contracția musculară, care depinde de actină și miozină; (2) unduirea cililor și a flagelilor și deplasarea cromozomilor în diviziunea celulară, care depind de dineină („dynein") și tubulină și (3) deplasarea veziculelor pe microtubuli, în care kinezina are un anumit rol. În toate aceste sisteme se leagă ATP, cauzând tranziții conformaționale în proteine, care sunt inversate prin hidroliză. Mușchiul va fi considerat primul, urmat de sistemele nemusculare.
Există două clase principale de mușchi: striați și netezi. Mușchiul striat este tipic mușchiului scheletic, care este sub control nervos voluntar și dă contracție rapidă. Mușchiul striat este subdivizat la rândul lui în fibre contractile rapide și lente. Fibrele rapide sunt eliminate rapid în timp ce fibrele lente pot funcționa pentru mai mult timp. În om, fiecare mușchi striat are un amestec de două tipuri de fibre. Mușchiul inimii este striat dar are o structură diferită și este sub control nervos involuntar. Mușchiul neted se găsește în intestin și în vasele sangvine și este sub control nervos involuntar. El acționează încet dar contracția poate fi menținută pe perioade extinse. În toate tipurile de mușchi, rezerva de ATP e mică dar poate fi crescută dintr-un rezervor de creatinfosfat (vezi p. 115).

MUȘCHIUL STRIAT

Structură generală

Mușchiul striat este compus din fibre (miofibre) care conțin miofibrile, fiecare microfibrilă este înconjurată de un sac membranar, reticul sarcoplasmic. Aceste aranjări sunt arătate în fig. 5. 27. Membrana plasmatică

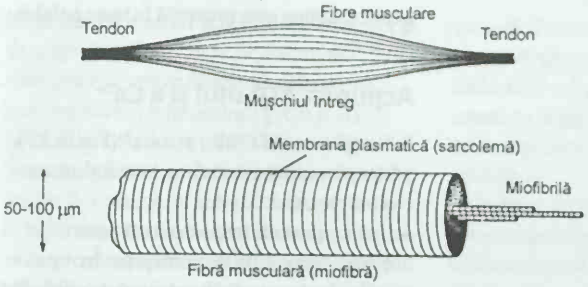


Fig. 5.27. Arhitectura generală a mușchiului striat.

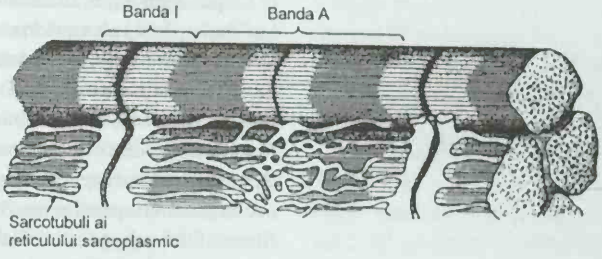


Fig. 5.28. Mușchi striat sub microscop. Benzile A și I sunt responsabile pentru aspectul striat. Reticulul sarcoplasmic conține o proteină majoră, ATPaza. Când mușchiul este stimulat, reticulul sarcoplasmic eliberează Ca^{2+}, este apoi pompat înapoi în reticulul sarcoplasmic de către ATPaza stimulată de Ca^{2+}.

este numită sarcolema, excitată prin terminațiile ei nervoase; ea împrejmuiește citoplasma, nuclee multiple și mitocondrii. Unitatea funcțională este numită sarcomeră, care se repetă de-a lungul axei fibrilei. După cum se vede în fig. 5.28, banda întunecată A și banda luminoasă I alternează în mod regulat. Regiunea centrală a benzii A, numită zona H, este mai puțin densă decât restul benzii. Banda I este bisectată de un disc Z îngust și foarte dens sau o linie Z (Z de la „Zwischen", sau diviziune). La contracția mușchiului, discurile Z se apropie unele de celelalte, în acest fel scurtând sarcomerele.

Filamentele subțiri și groase în contracția musculară

Sunt două tipuri de filamente proteice de interacțiune într-o sarcomeră, aranjamentul lor este arătat în fig. 5.29. Filamentele groase, care sunt compuse în principal din miozină, au un diametru în jur de 15 nm; filamentele subțiri, care sunt compuse din actină, tropomozină și troponină, au un diametru în jur de 9 nm. Filamentele subțiri și groase interacționează cu punțile transversale, care sunt domenii ale moleculelor de miozină. Mușchiul se scurtează prin contracție la o treime din lungimea inițială. Modelul filamentului reglabil explică scurtarea, care implică filamentele groase și subțiri ce alunecă unele peste altele. Forța contracției este generată de un proces ce mută activ un tip de filament peste filamentul vecin de celălalt tip.

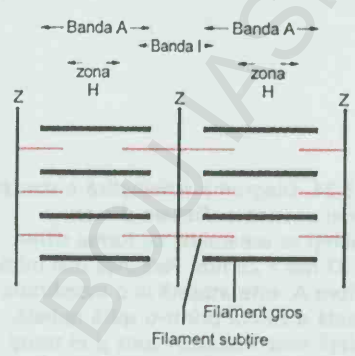


Fig. 5.29. Filamente groase și subțiri în contracția musculară. Vezi textul pentru explicații.

Miozina

Miozina are trei activități biologice: (1) moleculele de miozină se asamblează spontan sub formă de filamente în soluții fiziologice; (2) o ATPază furnizează energia liberă pentru contracție; (3) se leagă la forma polimerizată a actinei (F actină), constituentul major al filamentelor subțiri. Actina și miozina formează un complex numit actomiozină, capabil pentru contracție. Actomiozina este disociată sub acțiunea ATP.

Miozina este o proteină mare, formată din 6 lanțuri polipeptidice: două lanțuri grele identice și două perechi de lanțuri ușoare. După cum se vede în fig. 5.30, molecula conține o regiune globulară cu două capete, atașată la o catenă („rod") foarte lungă Aceasta este o spirală răsucită sub formă de α-helix dublu catenar format din lanțuri grele. Lanțul greu al fiecăruia din cele două capete leagă două lanțuri ușoare diferite. Proteoliza limitată a miozinei a generat o imagine a funcționării ei. În fig. 5.31, săgețile roșii indică punctele în care lanțul polipeptidic de miozină poate fi clivat de către diferiți agenți la variate componente: HMM, meromiozină grea; HMM-S_1, partea de la capăt a meromiozinei grele; LMM, meromiozină ușoară; DTNB (ditionitrobenzen), lanț ușor. LMM, ca și

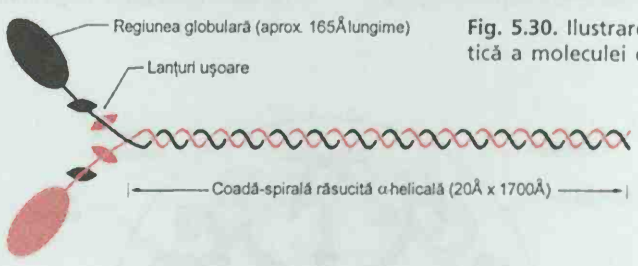


Fig. 5.30. Ilustrarea schematică a moleculei de miozină.

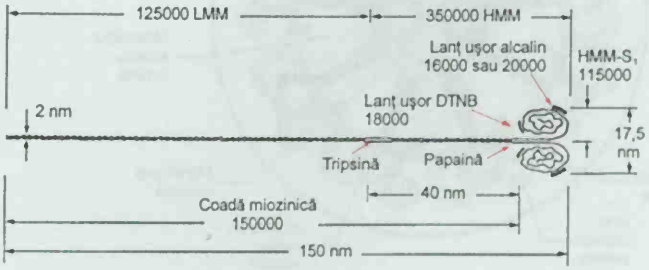


Fig. 5.31. Locurile de clivare (săgeți roșii) a diferiților componenți ai miozinei de către reactivi diverși. Vezi textul pentru explicație.

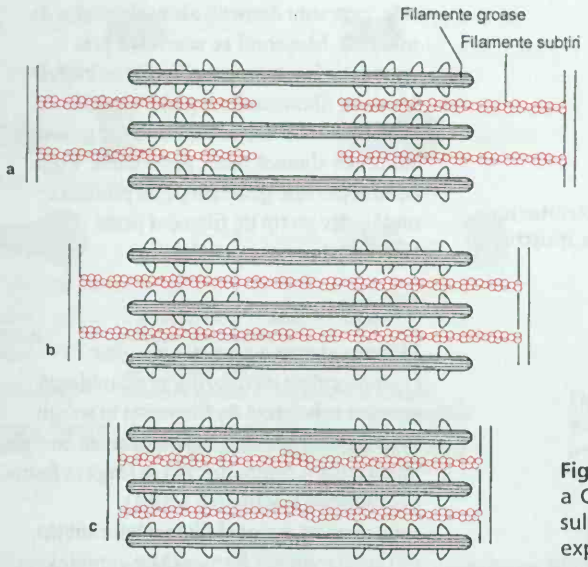


Fig. 5.32. Acțiunea ATP-ului și a Ca^{2+} pentru inițierea procesului de contracție. Pentru explicații vezi textul.

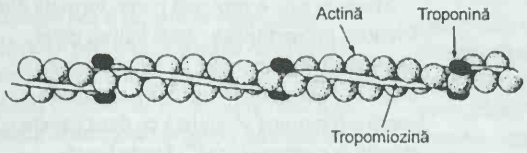


Fig. 5.33. Un model al filamentului subțire.

miozina, formează filamente, dar îi lipsește activitatea ATP-azică și nu se combină cu actina. HMM catalizează hidroliza ATP-ului și se leagă la actină, dar nu formează filamente. Poate fi divizată în două subfragmente globulare identice (fiecare numit S_1), și un subfragment sub formă de coadă (numit S_2). S_1 conține un loc ATP-azic, un loc de legare a actinei și două locuri de legare a lanțului ușor. HMM-S_1 este forța generatoare a unității de miozină. Formarea și disocierea complexelor ciclice dintre actină și S_1 conduce la alunecarea filamentelor subțiri și groase.

Actina

Actina este componentul major al filamentelor subțiri (vezi mai departe), forma fibroasă fiind F-actina, care este de asemenea o ATP-ază. În micrografiile electronice, filamentele subțiri apar mai degrabă ca două șiruri de mărgele răsucite între ele. Fiecare monomer din filament intră în contact cu alți patru. După cum se va explica, actina este prezentă în toate celulele eucariote.

Acțiunea ATP-ului și a Ca^{2+}

Sub acțiunea ATP-ului și a Ca^{2+}(Fig. 5.32), partea din capăt a miozinei interacționează cu complexul actină-troponină-tropomiozină pentru inițierea procesului de contracție. În mușchiul relaxat, când concentrația citosolică a Ca^{2+} este scăzută, actina și miozina sunt ținute sub control de tropomiozină și de complexul troponinic.
În timpul contracției, filamentele subțiri („a" în fig. 5.32) alunecă în sens contrar față de capătul miozinei până când se întâlnesc („b") și se suprapun („c"). Tropomiozina este o coadă de tip helix dublu catenar, în timp ce troponina este un complex de trei lanțuri polipeptidice: unul leagă calciul, unul actina și altul tropomiozina. Structura filamentului subțire este arătată în fig. 5.33.

MUȘCHIUL NETED

Mușchiului neted îi lipsesc striațiile și nu are structură sarcomerică aceasta fiind caracteristică mușchiului striat. Ca răspuns la semnale ce stimulează răspunsul contractil, moleculele de miozină polimerizează în mănunchiuri bipolare și moleculele de actină polimerizează în filamente. În absența acestor semnale, polimerii disociază în molecule simple. Mușchii netezi au doar o rețea de tip reticul sarcoplasmic împrăștiat și depinde de Ca^{2+} intrat în celulă din spațiul extracelular. Contracția este reglată de gradul de fosforilare al lanțurilor sale ușoare de miozină.

SISTEME NEMUSCULARE

Celulele eucariote au o organizare internă numită citoschelet care dă celulei forma ei distinctivă și capacitatea de a transporta

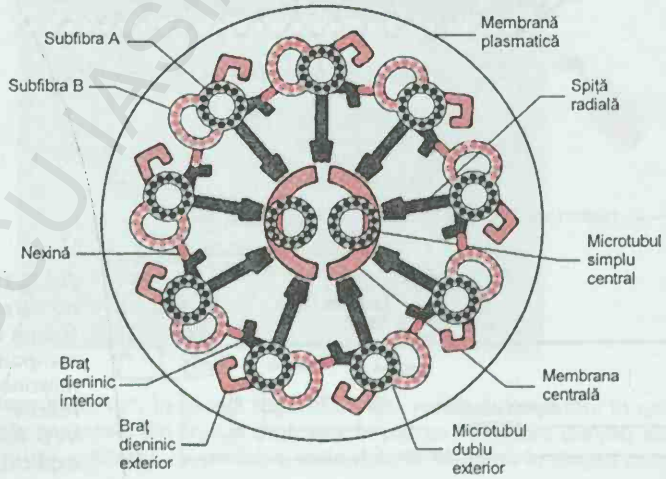


Fig. 5.34. Diagrama schematică a structurii unei axoneme. Fiecare din cei 9 dubleți se aseamănă cu forma cifrei opt, 37 nm x 25 nm. Perechea mai mică, subfibra A, este atașată la o membrană centrală a cilului printr-o spiță radială. Dubleții microtubulilor sunt și ei ținuți împreună prin legături nexinice. Din fiecare subfibră A apar câte două brațe. Toate brațele dintr-un cil se îndreaptă în aceeași direcție.

BCU IAȘI/CENTRALA UNIVERSITARĂ

vezicule, de a suferi schimbări ale formei şi migraţii. Există trei clase de ansambluri filamentoase: microfilamente, filamente intermediare şi microtubuli (vezi p. 3). Microfilamentele (p. 194) sunt constituite din actină. Filamentele intermediare (p. 196) conţin 2-3 catene de spirale răsucite de tip α-helix flancate de diverse secvenţe. Un exemplu este reprezentat de keratinele din păr. Microtubulii (p. 196) sunt structuri cilindrice scobite formate din două tipuri de subunităţi similare: α şi β-tubulina. Peretele rigid al microtubulului este format din subunităţi alternante de α şi β-tubulină. Microtubulii sunt componenţi principali ai cililor şi flagelilor eucariotici care sunt constituiţi dintr-un mănunchi de fibre numit axonemă; aceasta este înconjurată de o membrană ce este continuă cu membrana plasmatică. Fig. 5.34. reprezintă o diagramă schematică a structurii unei axoneme. O ATP-ază, numită dineină („dynein"), localizată în braţele subfibrei A, poate fi extrasă. Dineina este o proteină foarte mare, cu masă apropiată de a ribozomului; are un ciclu ATP-azic similar miozinei, care conduce la alunecarea microtubulilor adiacenţi paraleli care cauzează curbarea axonemei.

In timpul separării cromozomilor-fiice în mitoză, microtubulii sunt formaţi prin adăugarea moleculelor de α şi β-tubulină la filamentele preexistente sau la centrii nucleaţiei. Majoritatea microtubulilor produc rapid asamblări şi dezasamblări, o proprietate numită instabilitate dinamică. Colchicina inhibă toate procesele care depind de microtubulii funcţionali prin blocarea polimerizării lor. Taxolul are efect contrar; el stabilizează tubulina în microtubuli şi iniţiază polimerizarea.

Veziculele şi organitele sunt transportate de kinezină, o proteină mare conţinând câte două subunităţi mici şi mari, cum se vede în fig. 5.35. Un capăt al moleculei de kinezină interacţionează cu un microtubul iar celălalt capăt „agaţă" încărcătura pentru transport. Hidrolizarea ATP-ului de către kinezină este strâns cuplată cu legarea ei la un microtubul şi cu generarea forţei.

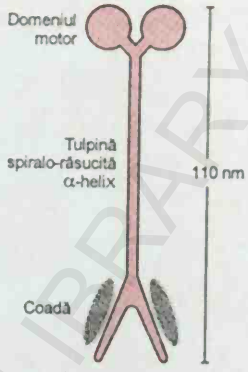


Fig. 5.35. Kinezina are două capete, o tulpină spirală-răsucită de tip α-helix şi o coadă bifurcată. Două lanţuri uşoare, 70 kDa (gri) sunt asociate cu două lanţuri grele de 11 kDa (roşu).

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Structura și funcțiile enzimelor

6

Transformările chimice din sistemele biologice sunt catalizate de proteine cu rol de enzime, dar și anumiți acizi nucleici („ribozymes") pot cataliza reacțiile chimice, de exemplu îmbinarea ARN („ARN splicing"). Plierea catenei polipeptidice a enzimelor este importantă în crearea organizării conformaționale sau spațiale a *situsului activ*, unde compușii care urmează a fi transformați se leagă formând complexul enzimă – substrat. Cinetica enzimatică descrie aceste interacțiuni din punct de vedere matematic.

Acest capitol discută factorii care afectează abilitatea enzimelor de a cataliza reacții. Temperaturile extreme sau pH-ul denaturează componenta proteică și inactivează enzimele. La temperaturi până la 50°C activitatea enzimelor crește cu temperatura. Enzimele prezintă un interval optim de activitate ce este determinat de ionizarea aminoacizilor din catenă, mai ales a acelor constituenți ai situsului activ. Sunt prezentate diferitele mecanisme prin care inhibitorii pot afecta reacțiile enzimatice: competiția cu un substrat similar, formarea unor legături și blocarea situsului activ, formarea unor legături cu un alt situs (alosteric) și alterarea structurii enzimei (situsului activ). Acestea din urmă apar în mod uzual în proteinele multisubunitare. Activitatea enzimelor poate fi de asemenea reglată prin modificări covalente, în particular prin fosforilări și defosforilări. Proteinele cu structuri diferite, ce catalizează aceleași reacții (izoenzimele) furnizează un nivel suplimentar al reglării.

Cofactorii sau coenzimele sunt molecule mici ce participă la reacțiile enzimatice dar nu se consumă în aceste reacții. Pot fi ioni metalici sau alte biomolecule și pot face parte din situsul activ sau se pot lega de acesta doar în timpul secvenței de reacție. Sunt prezentate importanța coenzimelor și rolul vitaminelor hidrosolubile ca precursori ai acestor coenzime.

BCU IAȘI - UNIVERSITY LIBRARY

PROPRIETĂŢILE ENZIMELOR

PROPRIETĂŢI GENERALE

Transformările chimice din organismele vii sunt catalizate de proteine cunoscute sub denumirea de enzime şi, într-o mai mică măsură, de către molecule de ARN cunoscute sub denumirea de ribozime („ribozymes"), implicate de exemplu, în îmbinarea ARN („RNA splicing") (vezi p. 38). Enzimele măresc viteza cu care reacţiile ajung la echilibru. Ele nu modifică poziţia echilibrului şi nici sensul de reacţie, acestea fiind determinate de legile termodinamicii (vezi p. 81).

La fel ca şi proteinele, enzimele sunt sensibile la schimbarea temperaturii. Majoritatea enzimelor sunt denaturate la temperaturi mai mari de 50°C, iar activitatea lor catalitică scade (fig. 6.1.). Anumite enzime sunt stabile la temperaturi mai mari deoarece ele nu sunt denaturate la încălzire. Acestea sunt în general proteine mici ce nu posedă structură terţiară. Adesea sunt denumite în mod eronat „enzime termofilice", dar acest termen, „termofilic", este de regulă specific doar anumitor bacterii ce se dezvoltă la temperaturi înalte.

Enzimele sunt de asemenea dependente de pH, în primul rând datorită acţiunii directe asupra structurii proteice, valorile extreme de pH determinând denaturarea proteinelor, dar şi datorită schimbărilor induse de pH în ionizarea resturilor de aminoacizi din situsul activ (vezi p. 77). Sensibilitatea la schimbările de pH variază în funcţie de enzimă, aşa cum reiese şi din fig. 6.2. Viteza de reacţie este în general proporţională cu concentraţia enzimei, foarte adesea fiind o dependenţă liniară (fig. 6.3.). Cinetica enzimatică este un termen ce reuneşte studiile privind proprietăţile enzimelor, prin măsurarea constantei de reacţie în diverse condiţii de reacţie. Când se discută despre viteza reacţiei enzimatice este sugerată de fapt viteza teoretică, la începutul reacţiei, când se formează cantităţi neglijabile de produs de reacţie. Aceasta este cunoscută ca viteză iniţială, notată cu v_i.

Această viteză se poate determina utilizând tehnici specializate, în scopuri practice măsurându-se viteza în primele minute după adăugarea enzimei la amestecul de reacţie, când aceasta variază liniar, dând astfel analize acceptabile. Motivul pentru care se determină viteza iniţială de reacţie şi nu viteza după un anumit timp este faptul că studiul cineticii de reacţie este simplificată în cazul în care cantitatea de produs formată este neglijabilă. Un astfel de studiu a fost propus de Michaelis şi Menten, aceste nume fiind întotdeauna asociate cu ecuaţia dedusă la p. 78.

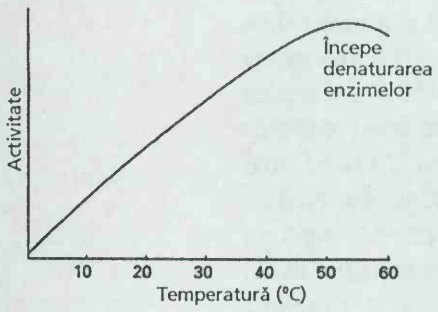


Fig. 6.1. Influenţa temperaturii asupra activităţii şi degradării enzimelor.

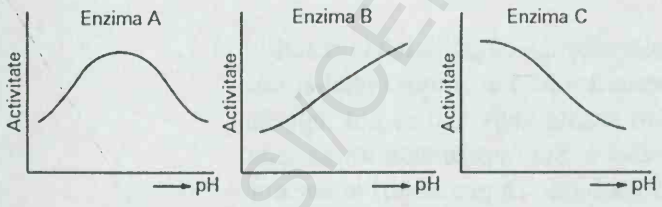


Fig. 6.2. Influenţa pH asupra activităţii enzimelor.

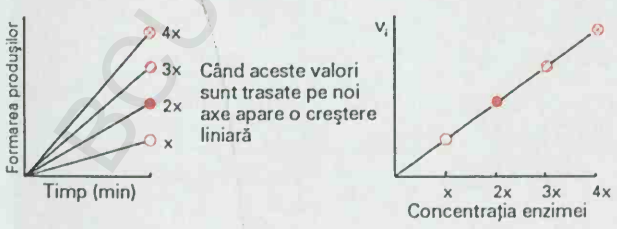


Fig. 6.3. Variaţia activităţii unei enzime în funcţie de concentraţie.

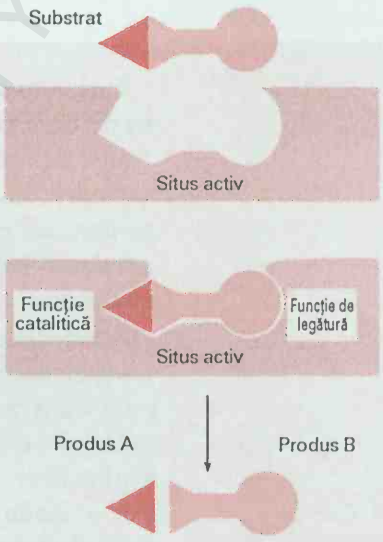


Fig. 6.4. Situsul activ are funcţii de legare şi catalitice. Anumite enzime prezintă o eficienţă catalitică atât de mare încât ele trebuie să catalizeze o reacţie de fiecare dată când întâlneşte substratul, contactul dintre substrat şi enzimă având loc, teoretic, la situsul activ. O astfel de enzimă este catalaza, ce catalizează transformarea a două molecule de H_2O_2 în două molecule de apă şi una de O_2.

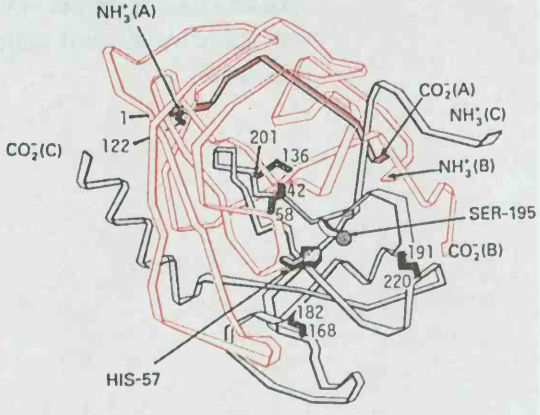


Fig. 6.5. Situsul activ este format prin plierea catenei polipeptidice a enzimei.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

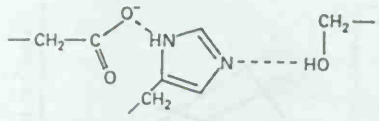
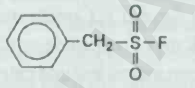
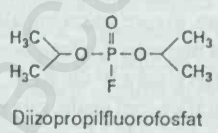


Fig. 6.6. Sistemul sarcinii retransmise.

NATURA SITUSULUI ACTIV

Situsul activ este o regiune din enzimă formată din aminoacizi, unii având rolul de a lega substratul în timp ce alții au funcție catalitică, așa cum reiese din fig. 6.4. Utilizând chimotripsina drept exemplu, în fig. 6.5. este reprezentat detaliat modul în care situsul activ se formează prin plierea catenei proteice. Resturile de aminoacizi ce formează situsul activ, în acest caz His – 57 și Ser – 195, pot avea poziții mult diferite în catena polipeptidică sau pot provenii chiar din catene peptidice diferite, His – 57 din catena B și Ser – 195 din catena C. Acești aminoacizi ajung în poziție alăturată prin plierea catenei. His – 57 și Ser – 195, împreună cu Asp – 102 (ce nu apare în fig. 6.5) sunt aminoacizii implicați în acțiunea catalitică a chimotripsinei. Aceeași aminoacizi au fost evidențiați în alte enzime proteolitice, printre care elastaza, și sunt implicați în mecanismul cunoscut ca sistemul sarcinii retransmise („charge relay system"), prezentat în fig. 6.6. Acest mecanism presupune ca restul de His – 57 să fie suficient de aproape astfel încât atomul de azot să formeze legături de hidrogen cu gruparea hidroxil a Ser – 195, iar Asp – 102 să formeze o altă legătură de hidrogen cu celălalt atom de azot din heterociclul His – 57. Termenul de „sistem al sarcinii retransmise" apare de la faptul că sarcina negativă este transmisă de la Asp – 102 până la hidroxilul Ser – 195, determinând reactivitatea mare a acestei grupări (hidroxilul devine puternic nucleofil). Carbonul grupării carbonil din legătura peptidică prezintă un astfel de centru și este astfel atacat de hidroxilul serinei. Activitatea acestui rest de serină conferă acestor clase de enzime numele de serin endopeptidaze, orice compus ce blochează hidroxilul serinei fiind inhibitor al acestor enzime. Anumite substanțe neurotoxice („nerve gases"), organofosfați ce conțin o grupare fosfat legată de carbon, sunt astfel de inhibitori. Atomul de fluor al diizopropilfluorofosfatului (pentru structură, vezi fig. 6.7) reacționează cu acest hidroxil, cu formarea unei legături covalente și eliberarea HF. Alți inhibitori pot bloca His – 57, cum este de exemplu florura de fenilmetilsulfonil (vezi structura în fig. 6.7) foarte des utilizată ca inhibitor al proteazelor.





6.7. Structurile diisopropilfluorofosfatului și a florurii de metilfenilsulfonil

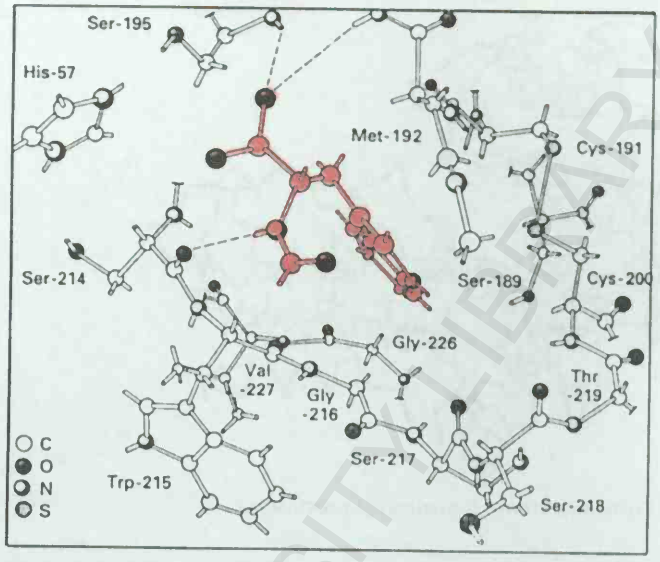


Fig. 6.8. Situsul activ al chimotripsinei.

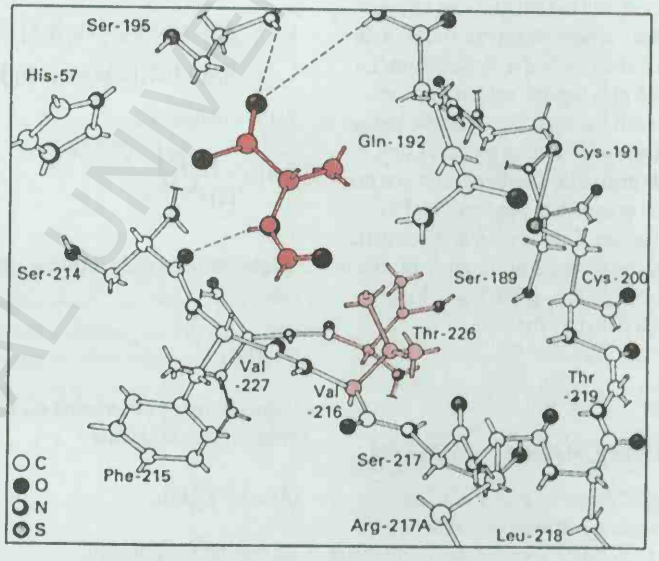


Fig. 6.9. Situsul activ al elastazei.

Situsul activ al chimotripsinei este prezentat în fig. 6.8, iar o altă serin endopeptidază, elastaza, este prezentată în fig. 6.9. Comparând cele două situsuri active observăm o mare asemănare în poziția His – 57 și Ser – 195 dar și anumite deosebiri. Astfel, elastaza conține resturi de Val – 126 și Tir – 226 (colorate în roz) ce nu sunt prezente în chimotripsină, glicina fiind aminoacidul corespondent în aceste poziții. Glicina este cel mai mic aminoacid, fără catenă laterală astfel situsul de legare al chimotripsinei se poate acomoda la o cantitate mai mare de substrat, N-formil-L-triptofanul, în timp ce cel al elastazei este prezentat aici ca legând N-formil-L-alanina. Situsul de legare al tripsinei este similar cu cel al chimotripsinei, cu excepția restului aspartat 189, acesta

BCU ASISCENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

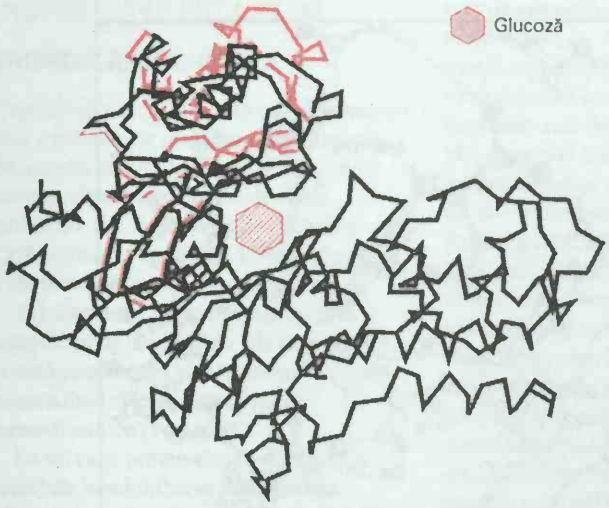


Fig. 6.10. Potrivirea indusă a enzimei şi substratului.

promovând legarea resturilor de catene încărcate pozitiv.

Un alt aspect al structurii terţiare a enzimelor, importantă în funcţionarea lor, este flexibilitatea, ce permite rotaţia atomilor de carbon din schelet. Conformaţia enzimelor este afectată prin legarea substratului, aşa cum reiese din fig. 6.10. Schimbările induse în hexokinază prin legarea glucozei sunt evidenţiate prin studii cristalografice cu raze x a enzimei cristalizate în prezenţa şi în absenţa glucozei. Liniile roşii arată că partea scheletului prezintă o conformaţie diferită în absenţa substratului. Acest fenomen este cunoscut ca potrivire indusă.

CINETICA ENZIMATICĂ

ECUAŢIA MICHAELIS – MENTEN

Michaelis şi Menten sunt cei care au propus o analiză matematică a cineticii reacţiilor enzimatice, numele lor fiind asociat cu ecuaţia dedusă în continuare. Deducerea acestei ecuaţii se bazează pe un model în care enzima (E) leagă un singur substrat (S) formând un complex enzimă – substrat (ES). Acest complex, în continuare, duce la formarea produsului de reacţie (P) cu eliberarea enzimei (E).

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} E + P \qquad (1)$$

k_1, k_{-1} şi k_2 sunt constantele de viteză ale reacţiilor indicate mai sus.

Presupunem că reacţia se află în starea iniţială, în care concentraţia ES rămâne constantă şi se formează o cantitate mică de produs, astfel încât reacţia inversă,

$E + P \rightarrow ES$

poate fi neglijată. Astfel:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1([E_t]-[ES])[S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] =$$

$$= 0 \quad ([E_t] \text{ este cantitatea totală de enzime})$$

$$k_1[E_t][S] - k_1[ES][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] = 0$$

$$k_1[E_t][S] = [ES](k_1[S] + k_{-1} + k_2)$$

LHS se divide cu k_1 :

$$[ES] = \frac{[E_t][S]}{[S] + \frac{k_{-1}+k_2}{k_1}}$$

Viteza iniţială (v) de formare a produsului este

$= k_2[ES]$

Când enzima este saturată cu substrat, viteza maximă devine

$(V_{max}) = k_2[E_t]$,

iar constanta Michaelis

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

$$\text{Astfel } v = k_2[ES] = \frac{k_1[E_t][S]}{[S] + K_m} \qquad (2)$$

$$= \frac{V_{max}[S]}{[S] + K_m}$$

Această ecuaţie se referă strict la reacţia unui singur substrat. La reacţiile la care participă mai multe substrate şi doar concentraţia unui singur substrat variază, viteza iniţială este dependentă de concentraţia substratului după o curbă hiperbolică ce poate fi analizată utilizând ecuaţia Michaelis-Menten. Într-adevăr, o relaţie de tipul Michaelis-Menten a fost observată în cazul multor procese ce implică formare de legături, transportul moleculelor prin membrană, legarea liganzilor (de exemplu hormoni) de receptori şi efectul

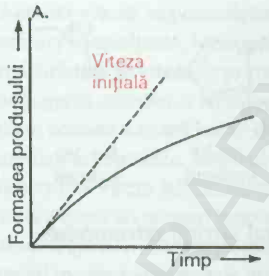


Fig. 6.11. Aproximarea vitezei iniţiale de reacţie.

unor medicamente. k_2 este cunoscută şi drept k_{cat}. Astfel, $v = k_{cat}[ES]$. La concentraţii mari de substrat (saturare), putem aproxima v la v_{max} şi [ES] la $[E_t]$, în aceste condiţii kcat putând fi calculată din relaţia $v_{max} = k_{cat}[E_t]$, dacă se cunoaşte concentraţia molară a enzimei.

EXPRIMAREA GRAFICĂ A ECUAŢIEI MICHAELIS-MENTEN

Dacă exprimăm grafic cantitatea de produs formată în funcţie de timp, viteza de reacţie scade pe măsura formării produsului (fig. 6.11). Aceasta se datorează faptului că produsul poate reacţiona cu enzima, reformând complexul ES ce induce reacţia inversă. În ecuaţia 1 nu se ţine cont de această reacţie deoarece ar fi complicat prea mult deducerea (vezi mai sus).

Dacă, într-o serie de experimente, concentraţia substratului creşte progresiv dar concentraţia enzimei şi condiţiile de reacţie nu se modifică, viteza iniţială, determinată în fiecare experiment, poate fi reprezentată grafic în funcţie de concentraţia substratului. Se obţine o curbă (similară în aparenţă cu cea a vitezei, dar de fapt foarte diferită) care se caracterizează prin formarea unui palier la concentraţii mari de substrat. Această curbă şi modul în care se obţine sunt prezentate în fig. 6.12, în care, în partea stângă sunt redate o serie de viteze iniţiale iar în partea dreaptă a graficul după 2 minute. Nivelul palierului, ce se obţine doar la concentraţii teoretice (infinite), reprezintă viteza maximă, sau V_{max}, din ecuaţia Michaelis – Menten, notată cu $V_{max}B^2$ în curba B^2 din fig. 6.13. Constanta lui Michaelis (Km) corespunde concentraţiei de substrat la care viteza iniţială este jumătate din viteza maximă. Dacă se utilizează concentraţii mai mari de enzimă se obţin curbe similare, în care viteza iniţială şi cea maximă sunt mai mari. Cu toate acestea, Km rămâne acelaşi (curba B^1 din fig. 6.13). Asemenea grafice sunt inadecvate pentru determinarea V_{max} şi K_m. În acest scop reprezentarea grafică se face după ecuaţia 2 transformată astfel:

$1/v = 1/V_{max} + (K_m / V_{max})(1 / S)$

UMF IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

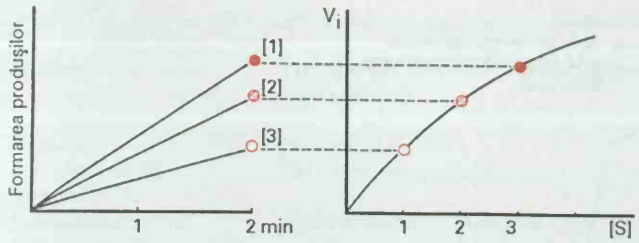


Fig. 6.12. Variația activității în funcție de concentrația substratului.

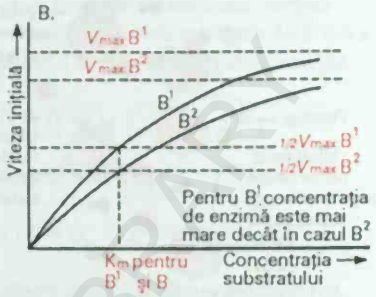


Fig. 6.13. Creșterea proporțională a concentrației enzimei cu V_{max}, K_m rămâne constant.

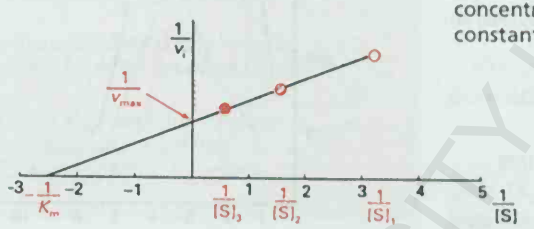


Fig. 6.14. Graficul Lineweaver-Burk.

Aceasta este ecuația dreptei în care 1/v și 1/[S] sunt variabile, intersecția cu ordonata reprezentând 1/vmax iar intersecția cu abscisa –1/Km. Această reprezentare grafică este cunoscută sub denumirea de graficul Lineweaver-Burg (fig. 6.14). O metodă alternativă utilizează reprezentarea grafică a variației *v*/[S] în funcție de v, cunoscută drept graficul Eadie-Hofstee (fig. 6.15).

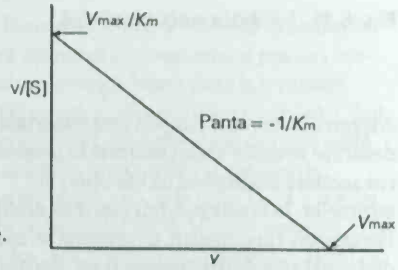


Fig. 6.15. Graficul Eadie-Hofstee.

INHIBAREA ENZIMELOR

Activitatea enzimelor este inhibată de compuși ce pot concura cu substratul în legarea la situsul activ sau compuși ce pot modifica situsul activ, de exemplu prin legarea covalentă la unul din resturile de aminoacizi implicați în activitatea enzimatică. În prezența unui astfel de inhibitor, viteza inițială este redusă, deci crește raportul 1/v. Aceasta poate influența graficul Lineweaver- Burg în diverse moduri, în funcție de natura inhibitorului. În inhibiția competitivă, atât substratul cât și inhibitorul se pot lega la situsul activ concurând la ocuparea acestuia, dreapta obținută intersectează ordonata iar V_{max} nu se modifică (fig. 6.16). Acest fapt poate fi interpretat în sensul că o concentrație foarte mare a substratului îndepărtează efectiv inhibitorul de situsul activ. De asemenea, K_m crește deoarece este nevoie de o concentrație mare de substrat pentru a ajunge la jumătate din viteza maximă de reacție. În inhibiția competitivă efectul inhibitorului este același cu cel rezultat prin blocarea unei părți din situsul activ, obținându-se rezultate similare cu cele în care este redusă concentrația de enzimă (fig. 6.17). V_{max} scade și K_m nu se modifică. Un al treilea tip de inhibiție este inhibiția necompetitivă. Aceasta apare în cazurile în care inhibitorul se leagă la situsul activ doar după ce substratul este legat de enzimă (deci se leagă de complexul ES), inhibând astfel formarea produșilor (fig. 6.18). În multe cazuri nu s-a obținut o reprezentare grafică (1/*v* funcție de 1/[S]) precisă în aceste tipuri de inhibiție, indicând astfel situații mai complexe. Aspecte mai complexe ale inhibiției sunt legate de enzimele alosterice reglatoare ce vor fi discutate ulterior (p. 85).

UTILIZAREA DETERMINĂRILOR ENZIMATICE ÎN DIAGNOSTIC

Determinarea activității enzimelor serice reprezintă un ajutor important în diagnostic. Nivelul activității unor numeroase enzime este crescut în diferite condiții patologice, ca rezultat al deteriorărilor celulare. Activitatea enzimatică depinde de compoziția soluției în care se desfășoară reacția.

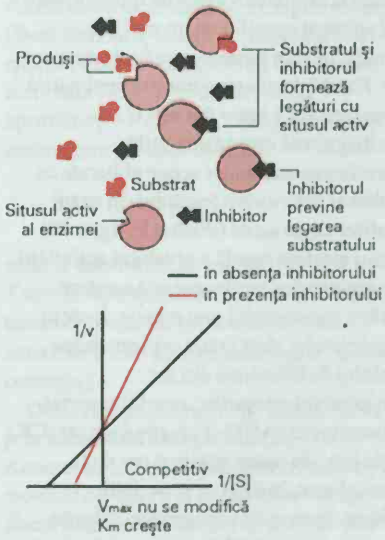


Fig. 6.16. Inhibiția competitivă.

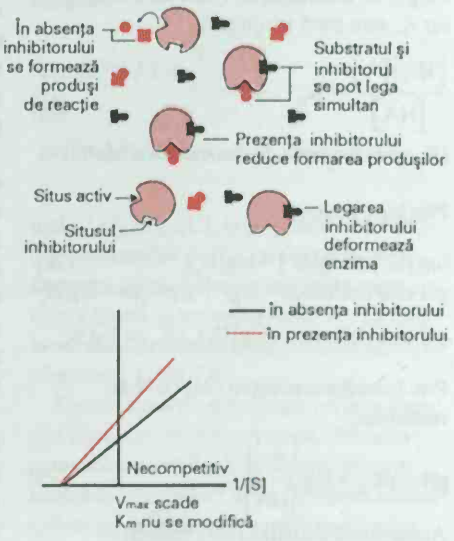


Fig. 6.17. Inhibiția non-competitivă.

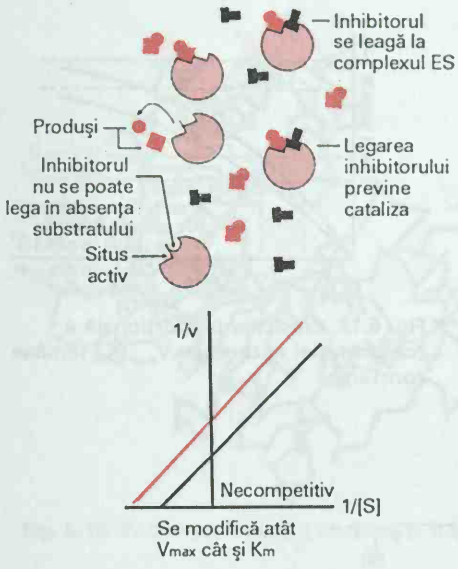


Fig. 6.18. Inhibiţia necompetitivă.

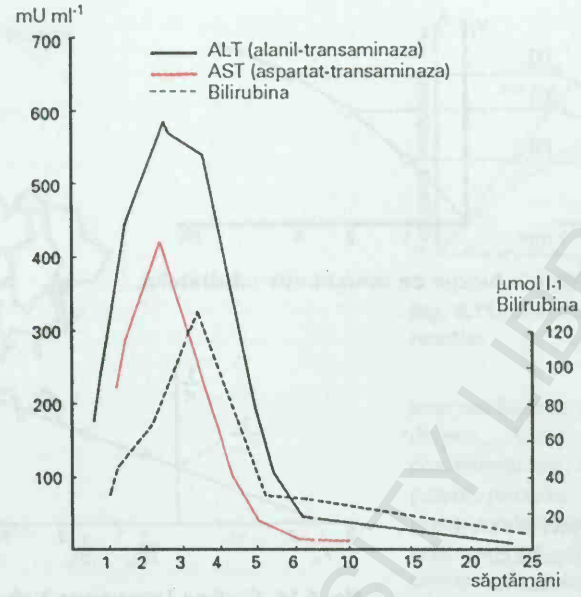


Fig. 6.19. Diagnosticul hepatitei virale.

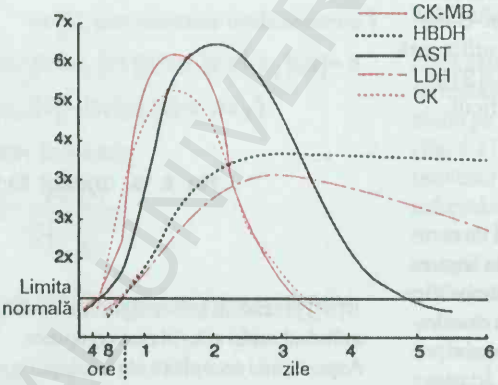


Fig. 6.20. Diagnosticul infarctului miocardic.

Alegerea sistemelor tampon este importantă deoarece anumite săruri utilizate în prepararea acestora pot acţiona ca inhibitori ai enzimelor. În aceste condiţii este utilă ecuaţia Henderson-Hasselbalch, ce prezintă relaţia dintre pH-ul soluţiei tampon şi pK fiecărui acid din care se prepară, deducerea acestei ecuaţii fiind prezentată în cadranul 6.1. În

Cadranul 6.1. Deducerea ecuaţiei HENDERSON-HASSELBALCH

În general, pentru o reacţie de echilibru

$$[A] \rightleftharpoons [A] + [B]$$

$$\frac{[AB]}{[A][B]} = K_{asociere} \text{ şi } \frac{[A][B]}{[AB]} = K_{disociere}$$

La pH de echilibru, HA este acid conjugat iar A^- este bază conjugată:

$$\frac{[H^+][A]}{[HA]} = K_a \qquad (1a)$$

(K_a este constanta de disociere a acidului)

Prin logaritmare:

$$\log [H^+] + \log[A^-] - \log[K_a] \qquad (2a)$$

pH este definit ca $-\log[H^+]$, pK_a ca $-\log K_a$

pH este definit ca $-\log[H^+]$, pK_a ca $\log K_a$

Prin înmulţirea ecuaţiei (2a) cu -1 şi rearanjare:

$$pH = pK_a + \log\frac{[A^-]}{[HA]} \qquad (3a)$$

Aceasta este ecuaţia HENDERSON-HASSELBALCH

determinarea enzimelor serice, inhibitorii şi activatorii, eventual prezenţi în ser, pot influenţa viteza de reacţie.

Unitatea utilizată în exprimarea activităţii enzimatice este katal (abrevierea: kat). Aceasta este definită ca activitatea catalitică ce duce la creşterea vitezei de transformare a unui substrat specific cu un mol per secundă, într-un sistem specific de determinare. Katal înlocuieşte „unitatea enzimatică" (abreviere: U) 1 kat = 6 x 10^7 U.

În diagnostic este adesea utilă determinarea enzimelor serice eliberate ca rezultat al deteriorării ţesutului. În cazul hepatitei virale acute (ilustrat în fig. 6.19) apare o creştere rapidă a nivelului activităţii transaminazelor serice; această creştere apărând considerabil mai repede decât în cazul icterului, fapt arătat prin creşterea nivelului de bilirubină din ser.

În infarctul miocardic, nivelul aspartat-transaminazei (AST) şi creatin kinazei (CK) creşte timp de aproximativ 6 ore de la episodul acut, în timp ce activităţile 3-hidroxibutarat dehidrogenazei şi lactat dehidrogenazei (LDH) cresc mai târziu. Au fost identificate trei izoenzime ale CK (vezi p. 115), cu subunităţi notate M (pentru muşchi) sau C (pentru creier). CK-MN este forma predominantă în muşchii scheletici, ce conţin de asemenea aproximativ 3% CK-MC. CK-CC a fost evidenţiat în ţesutul cerebral. În muşchii inimii, mai mult de 40% din totalul activităţii CK este determinat de CK-MC, de aceea nivelul acestei izoenzime în ser este des determinat în cazul infarctului miocardic, ca indicator exact al unor deteriorări a muşchilor inimii. Modificările în timp a nivelului activităţii unor diverse enzime serice, după infarctul miocardic, sunt prezentate în fig. 6.20.

Alte enzime şi proteine interesante din punct de vedere al diagnosticului sunt prezentate în tabelul 6.1. γ-Glutamiltransferaza catalizează reacţia:

Aminoacid + glutation =
γ-Glutamil-aminoacid + cisteinil glicină

Această enzimă poate fi implicată în transportul aminoacizilor prin membrană sau în protejarea glutationului. Prezintă un nivel crescut în sângele unor alcoolici, de obicei ca rezultat al combinaţiei dintre

BCU ASICENTRALĂ UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 6.1. Enzime interesante din punct de vedere al diagnosticului

Enzime	Principalele condiţii în care activitatea din ser este crescută
Amilaza	Pancreatită acută
Fosfataza acidă (pH optim: 5)	Carcinom de prostată
Fosfataza alcalină (pH optim: 10)	Boli ale ficatului, în special obstrucţie biliară; boli ale osteoblaştilor scheletici (rahitism)
Aspartat transaminaza (AST; anterior GOT)	Infarct miocardic; boli de ficat, în special deteriorări ale celulei hepatice
Alanin transaminaza (ALT; anterior GPT)	Boli de ficat, în special deteriorări ale celulei hepatice
Lactat dehidrogenaza (LDH)	Infarct miocardic; de asemenea creşte în multe alte îmbolnăviri (ale ficatului, anumite boli de sânge)
Creatin kinaza (CK)	Infarct miocardic; boli ale muşchilor scheletici (distrofie musculară, dermatomiozită)
γ- Glutamiltransferaza (γ -GT)	Boli de ficat, în particular obstrucţie biliară, alcoolism

deteriorarea ficatului şi inducerea enzimei. Cu toate acestea inducerea enzimei singure explică creşterea activităţii la anumiţi pacienţi ce nu prezintă alte semne de deteriorare a ficatului. Inducerea explică de asemenea creşterea activităţii sale la epilepticii ce consumă barbiturice. Aceasta se datorează faptului că alcoolul şi barbituricele determină proliferarea reticulilor endoplasmatici ducând la un nivel crescut al enzimei.

Enzima N-acetilglucozaminidaza apare în concentraţii crescute în urină, în cazul respingerii transplantului renal.

Deoarece prin metode cinetice se determină mai curând activitatea enzimei decât concentraţia acesteia, nivelul enzimelor serice este câteodată determinat prin radioimunoanaliză (vezi p. 69). În practică, marea majoritate a determinărilor enzimatice clinice sunt bazate pe acţiunea lor catalitică, deoarece aceste determinări pot fi mai uşor automatizate, la preţuri mai scăzute. Cu toate acestea determinarea masei se utilizează numai în anumite situaţii, cum ar fi:

- Determinarea izoenzimelor pentru care diferenţele în structura proteică pot fi explorate prin utilizarea antiserului specific (de exemplu, CK-MC şi LDH 1).
- Când enzima prezintă inhibitori naturali ai activităţii (exemplu tripsina din ser). Pot fi determinate şi alte proteine circulante din ser, fără activitate enzimatică.
- În diagnosticarea tumorilor: α-fetoproteina, o proteină formată în ficatul fetal, a fost evidenţiată în serul adulţilor cu hepatom şi teratom. Determinarea în fluidul amniotic ajută la diagnosticarea unor deficienţe ale tubului neural şi sindromului Down. Nivelul antigenului specific carcinomului de prostată este crescut în ser.
- Imunoglobulinele sunt determinate în stările de deficientă în anticorpi.
- Proteina C este determinată ca marker al răspunsului inflamator
- Nivelul albuminei indică starea funcţiilor biosintetice ale ficatului (vezi p. 62)

REGLAREA ŞI CONTROLUL METABOLIC

ENERGIA LIBERĂ ŞI REACŢIILE CHIMICE

Toate reacţiile chimice, inclusiv cele catalizate de enzime, se desfăşoară conform legilor termodinamicii. una din aceste legi defineşte energia chimică specifică oricărui compus chimic. Uneori, aceasta este numită energia liberă Gibbs (după chimistul american Willard Gibbs) şi se notează cu simbolul G. Pentru moleculele aflate în soluţie, energia liberă este dependentă de concentraţie. Energia liberă a unui compus în soluţie este egală cu energia liberă a unui mol înmulţită cu numărul de moli din acel compus. Energia liberă standard, notată G^o, este egală cu energia liberă a compusului la o unitate de activitate (în soluţii diluate fiind aproximativ 1 mol l^{-1}). Astfel, pentru un component *i* al unei soluţii:

$$G_i = G_i^o + RT \ln a_i \qquad (3)$$

unde R este constanta gazelor (8,134 J mol^{-1}), T este temperatura absolută şi a_i este activitatea componentului (în soluţii diluate, activitatea este aproximativ egală cu concentraţia).

Orice reacţie chimică este caracterizată prin variaţia de energie chimică, ΔG. Aceasta se calculează ca diferenţa, *la un moment oarecare în timp*, dintre energia liberă totală a reactanţilor şi cea a produşilor. ΔG se calculează ca energia liberă a produşilor minus energia liberă a reactanţilor, şi va fi negativă dacă suma energiei libere a reactanţilor este mai mare decât cea a produşilor. Cu alte cuvinte, pentru reacţia:

$$A + B \leftrightarrow C + D$$

la un moment în timp:

$$\Delta G = G_C + G_D - G_A - G_B$$

Utilizând ecuaţia 3 şi observând faptul că $G^o_C + G^o_D - G^o_A - G^o_B$ este variaţia standard de energie liberă a reacţiei (ΔG^o), atunci:

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln \frac{[C_C][D_D]}{[A_A][B_B]} \qquad (4)$$

unde $[A_A]$,$[B_B]$,$[C_C]$ şi $[D_D]$ sunt concentraţiile la momentul în care se calculează ΔG.

Toate reacţiile se desfăşoară în sensul în care compuşii dintr-un sens al reacţiei acumulează energie liberă până la o valoare egală cu cea a celor din direcţia opusă. Când energia liberă din ambele sensuri este egală se ajunge la un echilibru şi variaţia de energie liberă, ΔG, este nulă. Dacă o reacţia este scrisă astfel încât ΔG este pozitivă, ΔG pentru reacţia opusă va fi negativă, astfel că reacţia va decurge în această direcţie până la atingerea echilibrului.

Aşa cum s-a stabilit anterior, variaţia de energie liberă standard, ΔG^o, reprezintă variaţia energiei libere când toţi componenţii reacţiei sunt la o unitate de activitate (din punct de vedere practic 1 mol l^{-1}). Aceasta este o cantitate importantă ce este utilizată pentru a compara variaţia de energie liberă în diferite reacţii. Ea este constantă la temperatură constantă. Faptul că la echilibru $\Delta G = 0$ ne dă posibilitatea de a calcula ΔG^o. Din ecuaţia 4, prezentată anterior, la echilibru:

$$0 = \Delta G^0 + RT \ln \frac{[C]_E[D]_E}{[A]_E[B]_E} \qquad (4)$$

sau

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_{eq}$$

unde $[A]_E$,$[B]_E$,$[C]_E$ şi $[D]_E$ sunt concentraţiile compuşilor A, B, C şi D la echilibru. De remarcat că ΔG^o este utilizată pentru a indica faptul că un component, H^+, nu este la o unitate de activitate când determinarea se efectuează la pH 7,0.

Faptul că noi putem calcula variaţia energiei libere standard deschide posibilitatea comparării reacţiilor biochimice, prin utilizarea acestor valori, şi de asemenea studiul influenţei pe care o are asupra proceselor metabolice. Pentru un complex de reacţii, variaţia energiei libere este suma variaţiilor

UNIVERSITY LIBRARY

de energie liberă a reacţiilor individuale (numite şi reacţii parţiale).
Un interes special este acordat anumitor reacţii implicate în utilizarea şi formarea ATP. Variaţia de energie liberă standard în hidroliza ATP la ADP şi Pa este negativă şi este mai mare comparativ cu cea a hidrolizei unor esteri fosforici, cum este glicerol-3-fosfatul.

$ATP^{4-} + H_2O \rightarrow ADP^{3-} + Pa + H^+$
$\Delta G^\circ = -30{,}5$ kJ mol^{-1}

Glicerol 3-fosfat + H_2O → Glicerol + Pa

$\Delta G^\circ = -9{,}2$ kJ mol^{-1}

În trecut, expresia de „biomolecule macroergice" era utilizată în legătură cu ATP şi alţi compuşi ce se caracterizează prin valori similare de variaţie de energie liberă la hidroliză. Cu toate acestea este o expresie utilă doar ca o prescurtare, ea nefiind necesară şi poate fi evitată prin utilizarea unei terminologii mai corecte.

Datorită variaţiei mari a energiei libere în reacţia de hidroliză a ATP, procesele complexe în care aceasta este o reacţie parţială, se desfăşoară deseori în direcţia în care ATP este transformat la ADP şi Pa. În condiţiile în care este necesar ca ATP să fie menţinut în concentraţii suficient de ridicate, ADP trebuie fosforilat la ATP. Aceasta se poate realiza dacă reacţia este cuplată cu alte reacţii în care se formează suficientă energie liberă necesară fosforilării, cum ar fi oxidarea NADH în catena de respiraţie, ce este cuplată cu fosforilarea oxidativă (p. 125):

$NADH + H^+ + O_2 \rightarrow NAD^+ + H_2O$
$\Delta G^\circ = -222$ kJ mol^{-1}

ATP se formează de asemenea în timpul glicolizei, proces cunoscut sub denumirea de fosforilarea substratelor, de exemplu:

Fosfoenolpiruvat + ADP → piruvat + ATP

Legile termodinamicii determină evoluţia proceselor metabolice şi nu pot fi niciodată contrazise. Ele sunt adesea implicate în procese specifice: de exemplu, când este modificat raportul ATP – ADP sau NADH (NADPH) – NAD (NADP). Cu toate acestea există numeroase alte moduri în care se poate regla activitatea în diverse procese. Acestea sunt descrise în secţiunea următoare.

NECESITATEA REGLĂRII

Această secţiune se concentrează în principal asupra biochimiei animalelor superioare, deşi, multe din mecanismele descrise se pot aplica, uneori în forme modificate, pentru ansambluri celulare mai puţin complexe sau chiar pentru o singură celulă. Procesele metabolice trebuie să satisfacă cerinţele de supravieţuire ale organismului. Acestea cuprind activitatea sexuală şi de reproducere, creşterea şi dezvoltarea, mobilitatea, obţinerea de energie din substanţe nutritive şi, în multe organisme animale, nevoia de stocare a energiei,în forme uşor accesibile, spre metabolizare în perioadele de înfometare. În eucariotele superioare, activitatea metabolică este adesea controlată prin intermediul hormonilor şi a altor molecule mesagere, ce acţionează prin schimbarea nivelului unor substanţe din sânge sau prin semnale ale sistemului nervos. În alte cazuri, activitatea celulară poate fi controlată direct, prin modificarea mediului celular. În plus, procesele implicate în creşterea şi dezvoltarea celulelor, au loc atât în stadiul de embrion şi perioada post-natală cât şi în animalele adulte, menţinerea unui ţesut sănătos implicând un ciclu constant al regenerării şi morţii celulelor.

Influenţele majore din metabolismul celular îşi pot avea originea fie în activarea sau supresarea unor gene, fie în anumite procese din membrana plasmatică, cum ar fi: (a) recepţionarea, prin receptori specifici, a semnalelor primite din exteriorul celulei, de la hormoni sau alţi mesageri sau prin contactul cu alte celule; (b) preluarea, prin intermediul proteinelor transportoare specifice a unor molecule din exterior, ce sunt utilizate de către celule. Aceste activităţi ale membranei plasmatice sunt adesea rezultatul activării sau supresării unor gene.

Diferitele mecanisme ce modifică activitatea enzimatică ca răspuns la astfel de stimuli includ:

- Modificări în viteza de biosinteză a unor proteine, ca rezultat al activării sau supresării unor gene.
- Modificări în viteza de degradare a proteinelor.
- Fosforilarea şi defosforilarea proteinelor.
- Activarea unor mesageri secundari.

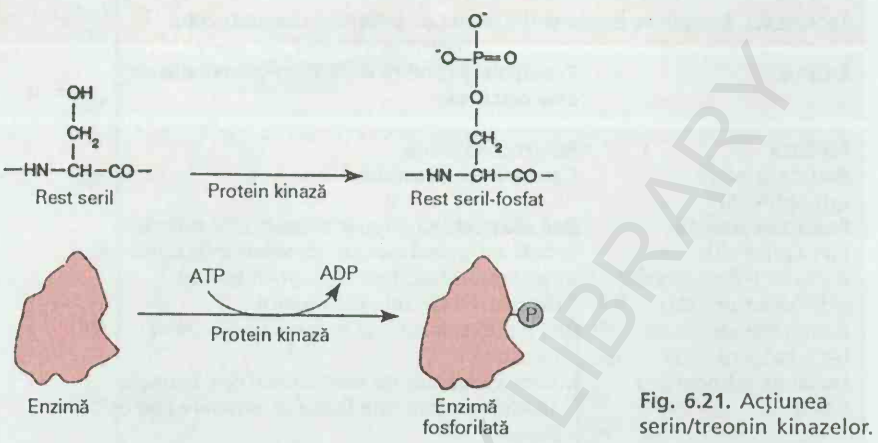


Fig. 6.21. Acţiunea serin/treonin kinazelor.

REGLAREA GENETICĂ

Activarea genelor este adesea indusă de semnale din exteriorul celulei ce acţionează asupra receptorilor. Aceasta poate rezulta din contactul cu celulele vecine, semnalul fiind transmis prin intermediul moleculelor aderate (vezi p. 197), interacţiunea cu hormonii, factorii de creştere şi alţi mesageri şi receptorii lor, sau prin preluarea unor substanţe nutritive prin membrana plasmatică. Principalele gene reglatoare sunt prezentate în capitolul 5 dar exemple specifice apar şi în alte capitole, în special în relaţia cu PEP carboxikinaza (p. 167) şi implicarea genelor în metabolismul lipoproteic (p. 169).

FOSFORILAREA ŞI DEFOSFORILAREA ENZIMELOR

PROTEIN SERIN / TREONIN KINAZE

Serin / treonin kinazele catalizează fosforilarea resturilor de serină şi treonină din proteine (vezi fig. 6.21). Sunt adesea cunoscute simplu ca S/T kinaze. Kinazele sunt asociate frecvent cu reglarea metabolismului intermediar. Sunt adesea activate de mesageri secundari (vezi p. 85) produşi ca rezultat al acţiunii hormonilor, dar pot fi de asemenea activate în timpul stimulării creşterii şi alte procese variate. Numeroase serin / treonin kinaze prezintă o mare specificitate şi sunt foarte importante. Două dintre cele mai importante sunt protein kinaza A (ce stimulează AMP – ciclic) şi protein kinaza C (ce stimulează Ca^{2+}). O nouă literă a fost recent alocată unei alte protein kinaze, protein kinaza B.

BIOSCIENTIFIC UNIVERSITY LIBRARY

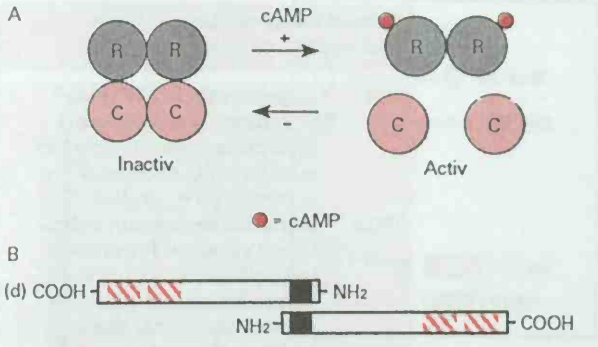


Fig. 6.22. Protein kinaza A disociază rezultând forma activă a enzimei. R reprezintă subunitatea reglatoare și C subunitatea catalitică.

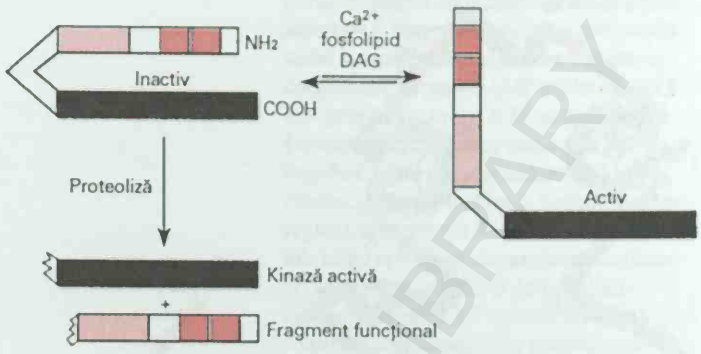


Fig. 6.23. Domeniile protein kinazei C.

Protein kinaza A (PKA) este activată de AMP – ciclic (vezi fig. 6.22 și paginile următoare). Este o protein kinază cu o mare specificitate, ce mediază numeroase din acțiunile AMP – ciclic, prin fosforilarea resturilor de serină și treonină din numeroase alte serin / treonin kinaze (de exemplu, glicogenfosforilaz kinaza, vezi p. 135). În proteina substrat există o secvență caracteristică de aminoacizi ce acționează drept țintă pentru situsul activ al PKA. Această secvență este (R sau K) – (R sau K) – X – (S sau T); de exemplu – RKXS-, unde X poate fi orice aminoacid. Înainte de activare, PKA există ca un complex de subunități catalitice și reglatoare. Așa cum este prezentat în fig. 6.22A, AMP – ciclic se leagă de subunitățile reglatoare determinând disocierea acestora de subunitățile catalitice, activând astfel protein kinaza. Domeniul subunității reglatoare, ce cuprinde două situsuri de legare a AMP – ciclic, este prezentat în fig. 6.22B, zona haşurată roşie, dimerizarea acestuia prin legarea a două subunități reglatoare ducând la crearea unui complex tetrameric inactiv, în absența AMP – ciclic.

Protein kinaza B (PKB) a fost inițial descoperită ca oncogenă *akt*, ea fiind discutată într-un capitol ulterior (Cap. 16).

Protein kinaza C (PKC) este activată de diacilglicerol și fosfolipide și, în cazul unor izoenzime, de către Ca^{2+}. Activarea este rezultatul acțiunii unui sistem mesager secundar, fosfoinozitol/ Ca^{2+} (vezi Cap. 15). PKC este o serin / treonin kinază ce acționează asupra unor numeroase substrate proteice. Activarea sa este adesea asociată cu reglarea creșterii și este activată de promotori tumorali de tipul forbol–esterilor ce imită diacilglicerolul. Domeniile identificate în PKC includ situsul activ al kinazei, desenat cu negru în fig. 6.23, și două situsuri de legare diacilglicerol / fosfolipide, desenate cu roșu. Alt domeniu, desenat cu roz, presupunem că este cel de legare a Ca^{2+}, din motive prezentate ulterior.

În identificarea funcțiilor acestor domenii, de ajutor a fost observația că prin proteoliză limitată, proteina se desface în două peptide, una din ele păstrând rolul catalitic iar cealaltă legând diacilglicerolul dependent de fosfolipide. După această separare, domeniul catalitic prezintă activitate proprie; acesta fiind activ în absența moleculelor activatoare diacilglicerol și Ca^{2+}. Aceasta indică faptul că în molecula modificată, domeniul reglator are funcție inhibitoare în prezența moleculelor activatoare iar diacilglicerolul și Ca^{2+} acționează pentru a înlătura această inhibiție, probabil prin modificarea conformației așa cum este prezentat în fig. 6.23. Familia enzimelor PKC se caracterizează prin numeroase izoenzime, inclusiv cele clasificate α - ξ. Domeniile structurale ale acestora sunt prezentate în fig. 6.24. Domeniile C1, C3 și C4 sunt identice în toate tipurile de izoenzime. Domeniile C3 + C4 reprezintă regiune catalitică C – terminală. Izoenzimele PKC δ, ε și ξ nu au domeniul C2. Faptul că PKC ε (și probabil și δ respectiv ξ) nu sunt dependente de Ca^{2+} se explică prin faptul că domeniul C2 conferă Ca^{2+} - dependența. Segmentele gri și negre reprezintă domeniile bogate în cisteină, cel puțin unul dintre acestea fiind prezent în toate izoenzimele PKCs. Această suprapunere a situsurilor de legare diacilglicerol / fosfolipide este reprezentată în fig. 6.23.

Ca^{2+}, CALMODULIN ȘI KINAZE DEPENDENTE DE Ca^{2+} / CALMODULIN

Variația concentrației intracelulare a Ca^{2+} reprezintă unul din sistemele reglatoare importante implicate în controlul funcțiilor celulare. Ca^{2+} poate funcționa ca o moleculă independentă dar, de asemenea, se poate lega de proteina calmodulin, a cărei structură este prezentată în fig. 6.25. Este o proteină mică, stabilă termic, cu M = 16790, ce a fost identificată în multe celule eucariote. Structura sa primară s-a păstrat perfect de-a lungul evoluției. Așa cum reiese din fig. 6.25, fiecare moleculă de calmodulin leagă patru ioni de Ca^{2+}.

Există o relație structurală între calmodulin și alte proteine ce leagă Ca^{2+}, cum ar fi troponin C, o proteină implicată în contracția musculară (vezi p.72) și parvalbumina, o alto proteină din mușchi. Această relație se extinde la aranjarea unui fragment din secvența de aminoacizi, prezentat în roșu în fig. 6.25, în care o serie de helixuri formează o structură cunoscută drept „mâna EF". Acest nume derivă de la faptul că în parvalbumină, proteina pentru care s-a propus prima dată această structură, două dintre helixuri sunt cunoscute drept E și F. Mâna EF este formată dintr-un domeniu helix – buclă – helix (HLH), care

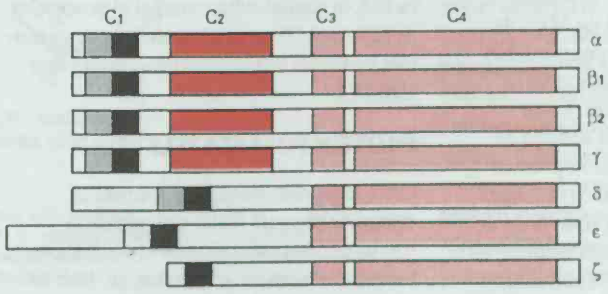


Fig. 6.24. Izoenzimele protein kinazei C.

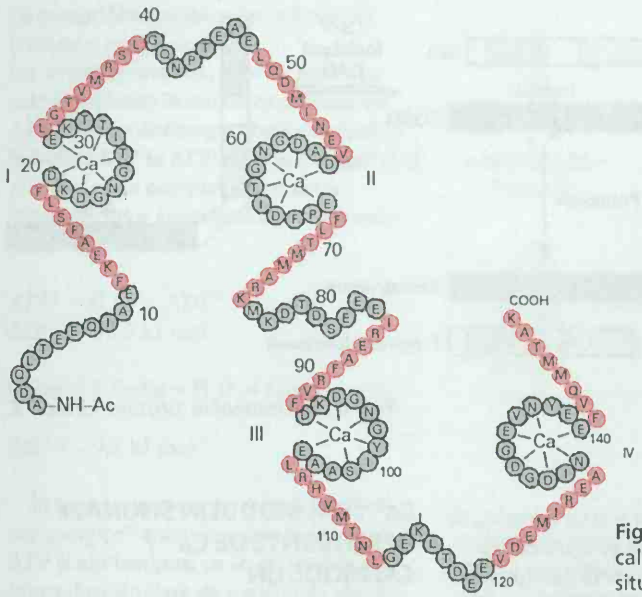


Fig. 6.25. Molecula de calmodulin conține 4 situsuri de legare a Ca^{2+}.

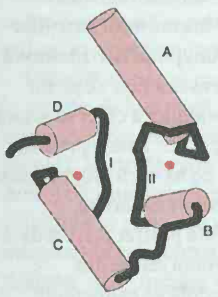


Fig. 6.26. Mâna EF.

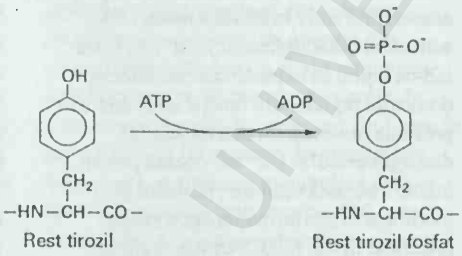


Fig. 6.27. Acțiunea protein tirozin kinazei.

formează o structură ce poate fi asemănată cu o mână umană, în care degetul arătător (reprezentat de helixul E) este îndreptat în față, al doilea (reprezentat de buclă) este îndoit în palmă și degetul mare (reprezentat de helixul F) este proiectat înafară, formând un unghi drept. O „mână EF" este ilustrată în fig. 6.26. Helixul A reprezintă degetul arătător al mâinii EF iar helixul B degetul mare, Ca^{2+} fiind reprezentat printr-un mic cerc roșu. Helixurile C și D sunt părți ale unei alte mâini EF. Bucla, desenată cu gri în fig. 6.25, cuprinde Ca^{2+}. Această buclă conține 6 – 8 atomi de oxigen din catena ce conține Asp și Glu, care împreună cu scheletul carbonil leagă selectiv Ca^{2+}, chiar în prezența unor concentrații de Mg^{2+} de 10^3 ori mai mari. Acest domeniu HLH apare deseori în pereche, calmodulin având două astfel de perechi. Când calmodulin fixează Ca^{2+}, va acționa ca activator a unor serin / treonin protein kinaze. Aici sunt incluse miozin kinaza, glicogen-fosforilaz kinaza și un grup de protein kinaze cunoscute sub denumirea de Ca^{2+} - calmodulin (CAM) kinaze.

PROTEIN TIROZIN KINAZE

Tirozin kinazele catalizează fosforilarea unor resturi specifice de tirozină din proteine țintă (fig. 6.27). Aceste kinaze sunt asociate cu reglarea creșterii, mulți dintre receptorii factorilor de creștere având această activitate. Primul tip este constituit din cele prezente în receptorii citoplasmatici și sunt astfel proteine membranare integrale (vezi Cap. 15). Aici sunt incluși receptorii factorilor de creștere ce prezintă activitate kinazică în citoplasmă. Cel de-al doilea tip este format din proteinele intracelulare. Acestea funcționează, de cele mai multe ori, mai jos de receptorii membranei plasmatice (adică, in stadiul subsecvențial al proceselor de activare). Tirozin kinazele sunt descrise mai în detaliu într-un capitol ulterior (vezi Cap.15).

PROTEIN FOSFATAZELE

Orice mecanism de reglare necesită ca sistemele să poată fi atât activate cât și inactivate. Acțiunea protein kinazelor este balansată de cea a fosfatazelor, ce

Tabelul 6.2. Clasificarea protein fosfatazelor din clasa I

PP1	Dependentă de ATP și Mg^{2+}, acționează mai ales asupra fosfoproteinelor implicate în metabolismul glicogenului și în contracția musculară
PP2A	Stimulată de compuși policationici cum sunt histonele sau polilisina și acționează asupra fosfoproteinelor implicate în glicoliză, gluconeogeneză, catabolismul aminoacizilor și biosinteza acizilor grași
PP2B	Enzimă Ca^{2+} dependentă de legare a calmodulinului care acționează asupra protein kinazelor și proteinelor fosforilate de către protein kinaza A
PP2C	Enzimă Mg^{2+}-dependentă ce acționează asupra protein kinazei dependente de AMPciclic

îndepărtează grupările fosfat printr-un mecanism simplu, hidrolitic.

Protein fosfatazele sunt clasificate în funcție de mecanismul lor de acțiune (tabelul 6.2). Clasa I a protein fosfatazelor conține mai ales enzime specifice serin / treonin fosfaților. Tot în această clasă sunt cuprinse fosfatazele 1 și 2 (PP1 și PP2) descrise în tabelul 6.2.

Clasa II a protein fosfatazelor cuprinde enzime variate ce hidrolizează protein tirozin fosfații. Proteinele ce prezintă activitate protein tirozin fosfatazică (PTPaze) pot fi proteine transmembranare sau intracelulare; unele fiind prezentate în fig. 6.28. În această figură sunt prezentate, pe de o parte, proteinele ce prezintă activitate protein tirozin fosfatazică (PTPaze) iar pe de altă parte este ilustrat conceptul general ce stă la baza analizei structurii proteinelor, și anume utilizarea comparării secvențelor ce identifică domenii caracteristice. Deseori, aceste domenii preiau numele proteinelor în care au fost prima dată identificate dar, cu toate acestea, ele prezintă o distribuție mai generală. Astfel, domeniul de omologie Src (SH) a fost identificat pentru prima dată în produșii oncogenelor *src* (vezi p. 193) dar apare în multe alte proteine. El conferă oricărei proteine în care este prezent abilitatea de a se lega de anumiți tirozinfosfați din proteinele țintă. Funcțiile acestor domenii nu au fost cunoscute în momentul în care au fost identificate. Așa cum reiese din fig. 6.28, PTPazele transmembranare conțin de obicei două domenii ce contribuie la activitatea lor, cunoscute ca D1 și D2, D1 fiind domeniul catalitic și D2 cel reglator.

BCU CENTRAL UNIVERSITY

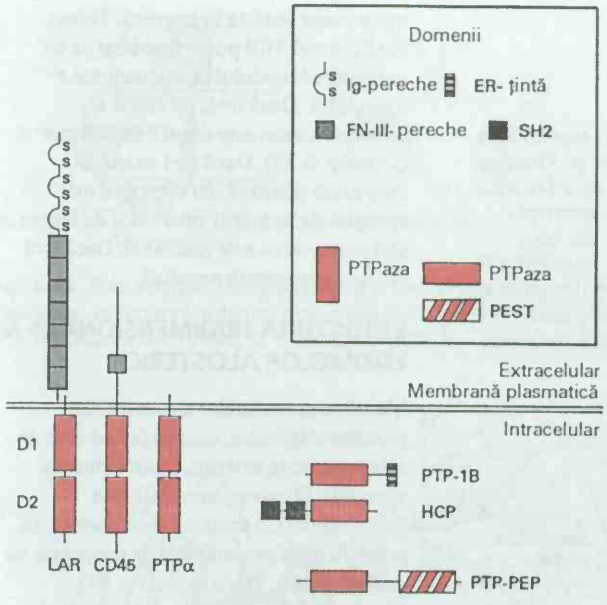


Fig. 6.28. Structurile unor protein fosfataze. LAR este PTP-aza antigen-specifică pentru leucocite, ce prezintă proprietăţi de adeziune şi poate fi implicată în migrarea celulelor. CD 45 este o proteină transmembranară limfocitară implicată în activarea limfocitelor (CD simbolizează clusterul determinant, indicând descoperirea lui ca antigen de suprafaţă). PTPa este PTP-aza implicată în sistemul de semnale asociat cu creşterea celulară. HCP este o proteină celulară hematopoietică, implicată în semnalizarea limfocitelor, ce prezintă două domenii SH2. PTP-1B, PTP-PEP şi PTP-H1 sunt alte PTP-aze solubile cu domenii caracteristice. Domenii: tip-Ig – domenii tipice descoperite în imunoglobuline; tip-FNIII descoperit în fibronectină; ţintă-ER – domenii ce se leagă la reticulul endoplasmatic; domenii omoloage SH2-Src (vezi p. 193); PEST – domeniu bogat în prolină (P), acid glutamic (E), serină (S) şi treonină (T), ce probabil controlează reciclarea („turnoverul") proteinelor.

MESAGERI SECUNDARI

AMP CICLIC ŞI GMP CICLIC

AMP ciclic a fost primul compus descoperit ca mesager chimic secundar, molecule cum sunt hormonii fiind mesageri primari. Rolul şi structura AMP ciclic au fost descoperite în timpul unor cercetări asupra unui activator al sistemului glicogen-fosforilază stabil la temperatură. Adenilat-ciclaza, ce catalizează formarea AMP-ciclic din ATP este prezentată în fig. 6.29, alături de fosfodiesteraza, enzimă ce catalizează hidroliza legăturii dintre fosfat şi hidroxilul 3 al ribozei. Adenilat ciclaza şi fosfodiesteraza reglează concentraţia AMP-ciclic. Potenţialii inhibitori ai fosfodiesterazei sunt teofilina (1,3 – trimetilxantina) şi derivatul său metilat, cafeina (1,3,7 – trimetilxantina). Acţiunea adenilat-ciclazei este descrisă detailat în Cap.15. Pe lângă efectele sale asupra metabolismului intermediar, AMP-ciclic acţionează asupra multor procese celulare cum sunt stimularea creşterii şi diferenţierea celulară. El mediază acţiunea multor hormoni şi gene, acţionând prin intermediul elementului de răspuns, CRE. Factorul de transcripţie asociat este CREB (vezi p. 190).

GMP – ciclic este sintetizat în mod similar, din GTP, sub acţiunea guanilil-ciclazei şi funcţionează ca mesager secundar în multe sisteme, nefiind însă la fel de cunoscut ca AMP – ciclic.

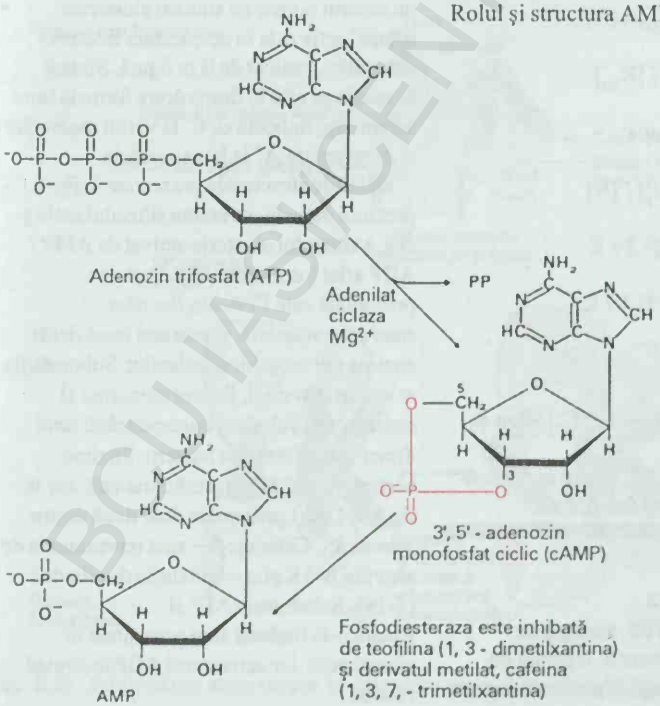


Fig. 6.29. Acţiunea adenilat-ciclazei şi a fosfoesterazei.

Ca^{2+} ŞI FOSFOINOZITOLI

Este un alt sistem mesager secundar dependent de enzimele ce scindează fosfoinozitolii, conducând la eliberarea Ca^{2+}, precum şi a unor produşi ce funcţionează şi ei ca mesageri secundari. Acest sistem este descris în Capitolul 15.

PROPRIETĂŢILE ALOSTERICE ALE ENZIMELOR

ASPECTE STRUCTURALE

Viteza reacţiilor enzimatice poate fi influenţată de prezenţa unor compuşi ce interacţionează cu enzima la nivelul unui situs diferit de situsul activ. Astfel de compuşi sunt cunoscuţi sub denumirea de modulatori alosterici, modificatori sau efectori alosterici iar situsul de care se leagă se numeşte situs alosteric. Astfel de enzime se caracterizează printr-o variaţie de tip sigmoid a vitezei de reacţie în funcţie de concentraţia substratului (fig. 6.30), ceea ce indică o colaborare în legarea moleculelor de substrat, similară cu cea evidenţiată în cazul legării oxigenului la hemoglobină. Dacă liganzii ce determină comportamentul alosteric sunt identici (de exemplu în cazul hemoglobinei) efectul este cunoscut ca homotropic. Dacă aceştia diferă între ei, efectul este heterotropic.

Comportamentul unei molecule alosterice poate fi analizat utilizând un model numit Monod-Wyman-Changeux, ce este prezentat în figura 6.31.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY

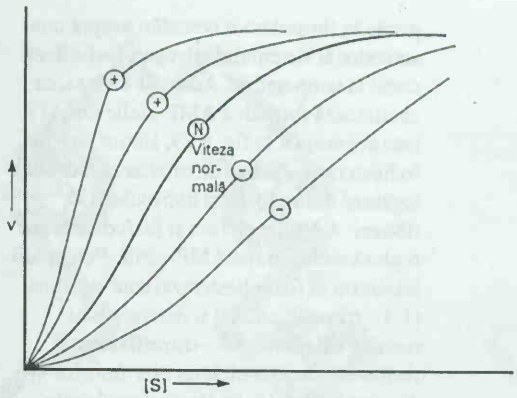


Fig. 6.30. Cinetica sigmoidă a enzimelor alosterice. Efectorii pot influența pozitiv (+) sau negativ (-) curba substrat–viteză; în fiecare caz sunt prezentate două concentrații diferite ale efectorilor, efectul crește odată cu creșterea concentrației efectorului.

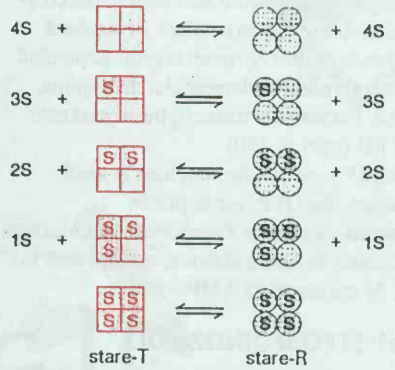


Fig. 6.31. Modelul Monod-Wyman-Changeux.

Acest model prezintă modul de legare a substratului în două stări diferite: starea T (tensionată) și starea R (relaxată) (prin comparare cu hemoglobina, vezi p. 54). Starea R predomină când este legat efectorul alosteric, în caz contrar predominând starea T. Dacă molecula se află în stare R, ca rezultat la legării unui activator alosteric, cinetica transformării va respecta ecuația Michaelis-Menten. Starea intermediară poate fi imaginată ca o formă hibridă, în care anumite subunități legate de substrat pot fi în stare R, în timp ce altele sunt în stare T. Au fost descrise și alte modele, ce includ multe combinații posibile dar ele conduc la o analiză mult prea complexă.

ANALIZA FENOMENULUI COOPERANT: ECUAȚIA HILL

Ecuația Hill este utilizată pentru a analiza situațiile în care în legarea substratului apare o cooperare. Este vorba de cazul în care există mai multe situsuri de legare, fiecare ligand favorizând legarea ligandului următor. Pentru simplificare, presupunem că liganzii ocupă simultan toate situsurile posibile astfel încât sunt prezente doar proteine complet ocupate sau libere. Ecuația Hill este dedusă în Cadranul 6.2.

În deducerea ecuației Hill, numeroase presupuneri au fost făcute în legătură cu faptul că ligantul se leagă la proteină, ceea ce nu se poate realiza în practică. Totuși, coeficientul Hill poate fi utilizat ca un indicator al modului de interacțiune a ligandului. Dacă n=1, nu există o cooperare, cum este cazul mioglobinei (vezi fig. 6.32). Dacă n>1 există o cooperare pozitivă, cu cât n este mai apropiat de numărul situsurilor de legare cu atât cooperarea este mai bună. Dacă n<1 are loc o cooperare negativă.

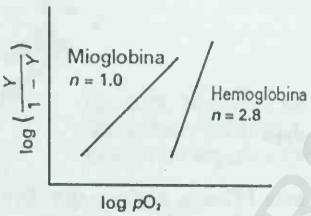


Fig. 6.32. Graficul Hill pentru mioglobină și hemoglobină.

Cadranul 6.2 Deducerea ecuației Hill

O expresie de echilibru poate fi scrisă:

$$K = [R][L]^n / [RL_n]$$

unde $[RL_n]$ este concentrația receptorilor cu n liganzi legați. În acest caz:

$$\gamma = [RL_n] / [R_{Tot}]$$

De aici $[RL_n] = [R_{Tot}] - [R]$

apoi $1 - \gamma = [R] / [R_{Tot}]$

și pentru a obține ecuația:

$$\gamma / (1 - \gamma) = [RL_n] / [R]$$

Dar $[RL_n] = [R][L]^n / K$

și astfel $\gamma / (1 - \gamma) = [L]^n / K$

se obținem

$$\log [\gamma / (1 - \gamma)] = n \log [L] - \log K$$

Aceasta este ecuația Hill, n este coeficientul Hill, γ este saturația fracțională.

STRUCTURA TRIDIMENSIONALĂ A ENZIMELOR ALOSTERICE

Majoritatea enzimelor alosterice sunt proteine oligomere, ceea ce ținând cont de cele prezentate anterior, explică cinetica sigmoidă. O excepție notabilă este hexokinaza D, o proteină monomerică, ce prezintă un comportament de cooperare cu substratul său, glucoza (vezi p. 89). Structuri tridimensionale au fost obținute pentru numeroase enzime alosterice. Un exemplu de astfel de enzimă reglatoare alosterică este fosfofructokinaza (FFK), implicată în glicoliză (vezi p. 122). Ea prezintă trei forme izomorfe ce sunt codificate de gene separate și se exprimă diferențiat în țesuturi specifice. Ele sunt notate A, B și C iar țesuturile în care apar în concentrații mai mari sunt mușchii, ficatul respectiv creierul. FFK este inhibată de ATP și citrat. Ea este activată de AMP / ADP și fructozo – 2,6 – difosfat (vezi p. 165). În mușchii șobolanilor există FFK tetramerică, fiecare subunitate fiind constituită din două domenii unite printr-o regiune helicoidală. Asamblarea celor patru subunități este prezentată în fig. 6.33. Astfel de tetramer prezintă patru situsuri active și un anumit număr de situsuri alosterice. Situsul activ este în despicătura fiecărei subunități, indicat de B în figură. Situsul alosteric se află în despicătura formată între subunități, indicată cu C′ la vârful moleculei și A respectiv A′ la baza acestuia.

Detaliile structurale prezentate în fig. 6.34 prezintă mai clar structura situsului activ și cea a situsului alosteric activat de AMP / ADP aflat între subunități. Proteina prezentată este FFK din *Bacillus stearothermophilis* și este mai mică decât enzima din mușchii șobolanilor. Subunitățile sale sunt mai mici, fiecare monomer al enzimei din șobolani corespunzând unui dimer al enzimei din bacterii. Enzima bacteriană există în formă tetrameră, dar în fig. 6.34 sunt prezentate doar două dintre subunități. Catenele $\beta-$ sunt reprezentate de săgețile A – K și $\alpha-$helixurile de cilindrii (1-13). Substratele ATP și fructozo-6-fosfatul sunt prezentate în situsul activ iar activatorul ADP în situsul efector.

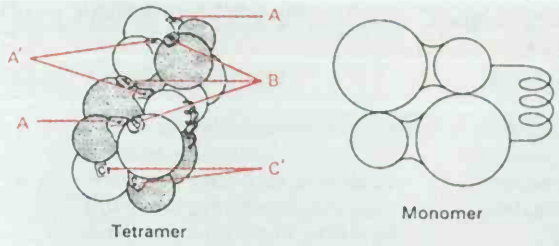


Fig. 6.33. Subunităţile componente ale fosfofructokinazei. Situsurile diferite indicate implicate, în legarea substratelor şi efectorilor sunt: A, fructozo-6- fosfat; A' – fructozo-2,6-difosfat; C' – inhibitor ATP; B – substrat ATP.

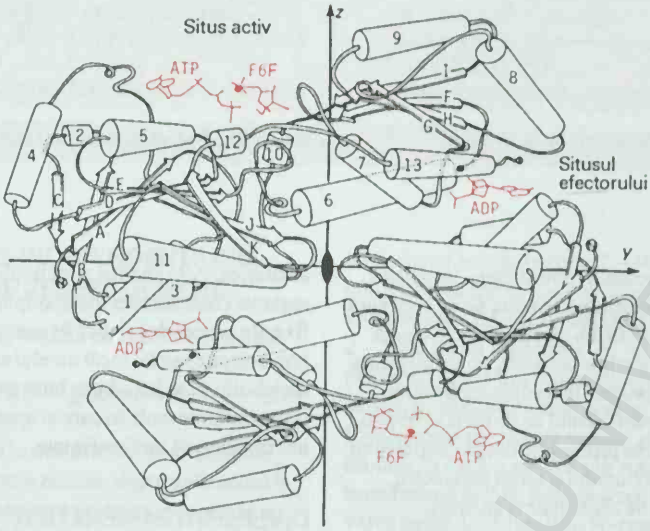


Fig. 6.34. Structura detailată a fosfofructo kinazei. Se remarcă 2 subunităţi ale tetramerului FKF de-a lungul axei x. Catenele β- sunt reprezentate de săgeţile (A-K) şi α-helixurile de cilindrii (1-13). Fiecare subunitate este formată din două domenii: domeniul 1 se află în stânga în untitatea superioară. Substratele ATP şi fructozo-6- fosfat (F6F) sunt prezentate în situsul activ iar activatorul ADP în situsul efector.

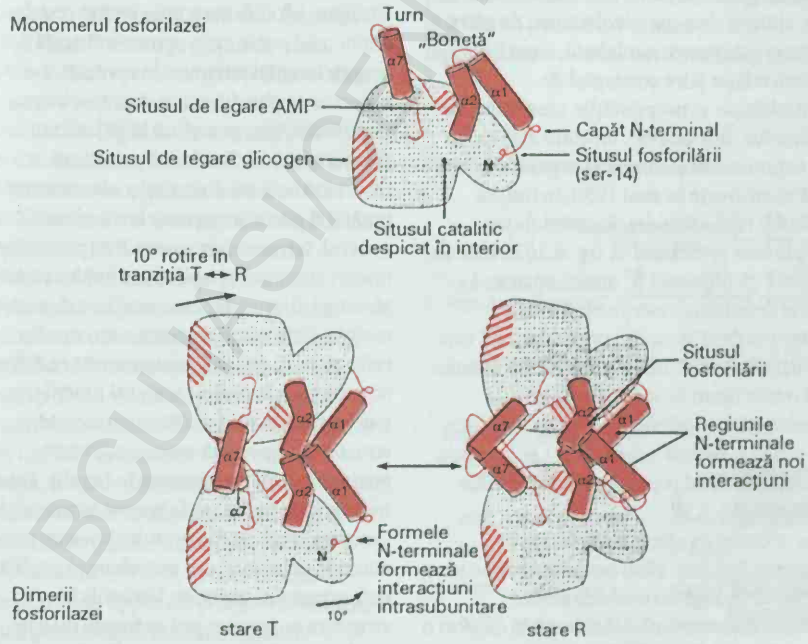


Fig. 6.35. Schimbările structurale în interconversia T ←→R a fosforilazei.

MODIFICĂRILE CONFORMAŢIONALE ÎN TRANZIŢIA T LA R

Este cunoscut faptul că structura tridimensională a enzimelor alosterice suferă modificări conformaţionale în timpul tranziţiei de la starea T la starea R. Aceste modificări au fost determinate pentru hemoglobină şi fosforilaza implicată în degradarea glicogenului. În fig. 6.35 sunt prezentate câteva din modificările care au loc în fosforilază. Enzima activă există sub formă de dimer. În partea superioară a figurii, pentru a evidenţia anumite trăsături ale moleculei, este reprezentat monomerul. Trei dintre helixurile moleculei (α1, α2 şi α7) au fost separate pentru a fi studiate, restul moleculei fiind reprezentat schematic, diversele situsuri de legare fiind reprezentate prin zone haşurate cu roşu. α-7 este numit helixul „turn" iar resturile 40-45 aflate între α1 şi α2 sunt numite „bonetă". Dimerii sunt prezentaţi în partea de jos a figurii, fiind indicate şi modificările care apar ca rezultat al tranziţiei T la R. Aşa cum se observă, monomerii sunt rotiţi cu 10° faţă de axa verticală iar cele trei helixuri îşi modifică orientarea, mai ales helixul „turn". Mişcarea acestui helix conduce indirect la schimbarea unui rest aspartat din situsul catalitic cu unul de arginină. Când Ser-14 este fosforilată, restul 20 de aminoacid N-terminal prezintă o conformaţie helicoidală ordonată, ce a fost observată de asemenea în starea R defosforilată (vezi p. 163 pentru discuţii ulterioare).

ANALIZA CONTROLULUI METABOLIC

SUPORTUL ISTORIC

Numeroase cercetări au fost făcute în analiza fluxului metabolic, în sensul identificării enzimelor responsabile în modificarea fluxului (flux este termenul utilizat pentru a definii viteza cu care metaboliţii traversează o cale metabolică). Acestea ar putea conduce la o mai bună înţelegere a proceselor fiziologice normale şi de asemenea ar putea fi de ajutor în identificarea moleculelor ţintă în acţiunea medicamentelor. Astfel de analize pot fi de asemenea utile în proiectarea unor procese biotehnologice. Primele cercetări au fost realizate în scopul identificării unor enzime ce ar putea exercita un real control asupra fluxului, aceste enzime numindu-se enzime reglatoare (sau enzime cheie). În multe cazuri s-a presupus că aceste enzime funcţionează în fazele de început ale proceselor sau la scurt timp după ramificare. Astfel de concepte nu au rezistat însă testului timpului. La ora actuală

se presupune că în controlul fluxului, şi mai exact în creşterea acestuia, sunt implicate mai multe enzime.

Pe de altă parte se consideră că în homeostazie – ce defineşte limitele concentraţiilor intermediarilor metabolici – sunt implicate proprietăţile intrinseci ale tuturor enzimelor implicate în proces. Un caz mai aparte este cel a anumitor enzime ce prezintă un rol special în retroinhibiţie.

COEFICIENTUL DE CONTROL AL FLUXULUI

Există deseori posibilitatea de a obţine condiţiile în care fluxul intr-un proces poate fi măsurat. În anumite cazuri este astfel posibilă examinarea modului în care schimbarea concentraţiei unei enzime poate modifica fluxul. Aceasta, pentru o enzimă oarecare, poate fi exprimată prin coeficientul de control al fluxului, coeficient definit în fig. 6.3. Dacă am putea măsura coeficientul de control al fluxului pentru fiecare enzimă participantă la proces atunci ne-am putea aştepta ca enzimele cu un coeficient mare să prezinte un potenţial mai mare în controlarea fluxului comparativ cu cele ce prezintă un coeficient scăzut.

Cadranul 6.3. Coeficientul de control al fluxului

$$\text{Coeficientul de control al fluxului} = \frac{\text{Variaţia fluxului}}{\text{Variaţia concentraţiei enzimei}}$$

Matematic, aceasta poate fi exprimată astfel:

$$C^{J_{ydL}}_{xase} = \frac{\delta J_{ydh}}{J_{ydh}} / \frac{\delta E_{xase}}{E_{xase}}$$

unde C este coeficientul de control al fluxului.
J_{ydh} este fluxul în etapa catalizată de enzima ydh (o dehidrogenază)
E_{xase} este cantitatea de enzimă xase (o hidrolază)

SENSIBILITATEA ŞI COEFICIENTUL DE RĂSPUNS

Considerăm că nu este cazul să prezentăm detaliat ecuaţiile matematice ce definesc diverşi parametrii implicaţi în analiza controlului metabolic, mai ales că aceştia constituie un domeniu controversat. Este însă utilă introducerea unor alte noţiuni privind controlul metabolic, cum ar fi cel numit de cercetători sensibilitate, iar de alţii coeficient de răspuns. Acesta ne dă o măsură a modului în care un efector, ce acţionează asupra unei enzime oarecare, poate influenţa fluxul unui proces. În analiza controlului metabolic, coeficientul de răspuns se obţine prin calcularea produsului dintre coeficientul de control al fluxului şi un alt parametru, coeficientul de elasticitate al enzimei.

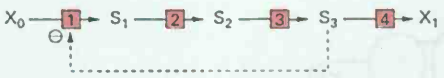


Fig. 6.36. Retroinhibiţie simplă.

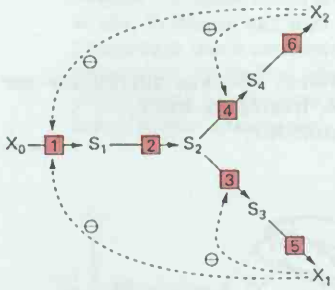


Fig. 6.37. Retroinhibiţie în cuib.

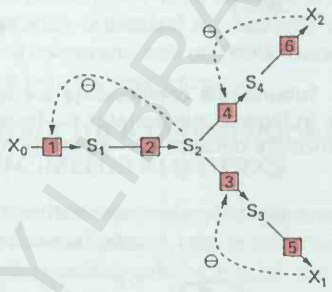


Fig. 6.38. Retroinhibiţie secvenţială.

RETROINHIBIŢIA (INHIBIŢIA PRIN „FEEDBACK")

Este cunoscut faptul că produsul final al unui proces metabolic poate inhiba transformarea substratului pe parcursul procesului. De exemplu, dacă izoleucina este adăugată la o cultură de *Escherichia coli*, sinteza *de novo* a izoleucinei de către bacterie este puternic inhibată. Există o strânsă relaţie între conceptul de retroinhibiţie şi proprietăţile alosterice ale enzimelor. Într-adevăr. efectele alosterice ale acţiunii enzimelor au fost pentru prima dată identificate în anul 1950, în timpul studiului retroinhibiţiei. Retroinhibiţia simplă este prezentată în fig. 6.36 în care se observă că produsul S_3 inhibă enzima 1. Astfel de inhibiţie este în mod normal alosterică dacă structura produsului S3 este similară cu cea a compusului X1.Se cunosc mai multe tipuri de reţele complexe de retroinhibiţie, două dintre acestea, inhibiţia „în cuib" („nested inhibition") şi inhibiţia secvenţială fiind prezentate în fig. 6.37, respectiv fig. 6.38.

În contrast cu efectele implicate în creşterea fluxului, când anumite enzime sunt implicate în legături unele cu altele, mecanismele retroinhibiţiei implică deseori o singură enzimă. Astfel de enzime sunt enzimele reglatoare, ce au proprietăţi alosterice. Alte enzime sunt implicate în reglarea concentraţiei metaboliţilor în etapele fixe ale proceselor (adică în controlul homeostatic) astfel încât nivelul acestor metaboliţi să se încadreze între anumite limite iar procesele în care ei apar ca intermediari să nu fie afectate.

DIVERSITATEA GENETICĂ A ENZIMELOR

VARIANTE ALE ENZIMELOR

Ca şi în cazul proteinelor (vezi, de exemplu, p. 58), o mare diversitate de structuri primare a fost evidenţiată pentru enzimele ce prezintă aceleaşi funcţii sau funcţii similare. Modificarea unui singur rest de aminoacid poate avea o mare influenţă asupra funcţiei enzimei. În contrast, s-a observat că alte diferenţe sunt asociate cu modificări minore şi chiar neglijabile în funcţia enzimei. Secţiunea următoare ilustrează această diversitate, alte exemple putând fi găsite în capitolele ulterioare. În general, termenul de izoenzime (prescurtat uneori izozime) se aplică enzimelor ce au structuri diferite dar care catalizează aceeaşi reacţie. Este acum aproape o eroare să ne referim la „o enzimă" din moment ce diferite structuri pot îndeplini aceleaşi funcţii particulare. În mai multe cazuri aceste structuri, ce prezintă aceeaşi activitate enzimatică, au fost grupate în familii. Totuşi, încă în mod uzual, se foloseşte termenul de „enzimă" referitor la proteinele asociate cu o anumită activitate, dar nu trebuie să neglijăm cele prezentate anterior. Variaţiile în structura enzimelor pot apărea în diferite moduri, unele dintre acestea fiind enumerate în tabelul 6.3.

BUCUREŞTI UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 6.3. Diverse forme ale enzimelor

Grup	Cauza multiplicităţii	Exemple
1	Proteine independente din punct de vedere genetic *	Malatdehidrogenaza din citosol şi mitocondrii
2	Heteropolimeri (hibrizi) a două sau mai multe catene polipeptidice ce nu sunt legate prin legături covalente*	Formele hibride ale lactat dehidrogenazei
3	Variante genetice (alelozime)*	Glucozo-6-fosfat dehidrogenaza la om
4	Proteine conjugate sau derivate:	
	(a)Proteine comjugate cu alt grup	Fosforilaza *a*, glicogensintaza D
	(b)Proteine derivate dintr-o singură catenă polipeptidică	Familia chimotripsinelor provenite din chimotripsinogen
5	Polimerii unei singure subunităţi	Glutamatdehidrogenaza cu Mr 1.000.000 şi 250.000
6	Diferite forme conformaţionale	Toate modificările alosterice

* Aceste clase intră în categoria izoenzimelor

PROTEINE INDEPENDENTE DIN PUNCT DE VEDERE GENETIC

Hexokinaza, enzima ce catalizează reacţia:

glucoză + ATP → glucozo-6-fosfat + ADP

poate exista în mai multe forme distincte genetic. Aceste enzime ilustrează modul în care existenţa unor proteine independente genetic, în legătură cu activitatea enzimatică, trebuie luată în considerare în analiza activităţii metabolice.

În ţesuturile mamiferelor au fost identificate patru forme distincte de izoenzime ale hexokinazei, notate hexokinaze A, B, C sau D sau hexokinaze I, II, III respectiv IV. Aceste izoenzime au o structură asemănătoare dar o diferenţă majoră este faptul că hexokinaza D este o proteină cu masa moleculară de aproximativ 50 Kda în timp ce restul au o masă moleculară de aproximativ 100 Kda. Este posibil ca proteinele mari să fi evoluat prin duplicarea sau fuziunea unor gene ancestrale necodificate, în timp ce una din ele, 50Kda hexokinaza, să fi rămas în formă de hexokinază D, ce are două jumătăţi ce prezintă secvenţe extinse de aminoacizi similare una cu cealaltă şi de asemenea cu hexokinaza D. Aceste sunt cunoscute ca jumătăţi N-terminale respectiv C-terminale, în cazul hexokinazei B, amândouă având un situs catalitic activ. Spre deosebire de acestea, în hexokinazele A şi C, doar jumătatea C-terminală este activă. Fig. 6.39 ilustrează un posibil model al evoluţiei genelor hexokinazei B, în care o genă ancestrală este duplicată şi legată în tandem (adică genele duplicate sunt legate în continuare) formând hexokinaza B a mamiferelor. Exon 1 codifică primii 21 de aminoacizi pe când exonii 2 – 10 şi 10 – 18 codifică jumătăţile N-terminale respectiv C-terminale, fiecare corespunzând exonilor 2 – 10 ai genei ancestrale. În fig. 6.39 sunt prezentaţi de asemenea parametrii cinetici pentru jumătăţile N-terminale şi C-terminale exprimate separat şi două mutaţii în care Asp-209 sau Asp-657 este transformat în Ala, ceea ce duce la inactivarea celor două jumătăţi N- respectiv C-terminale. O proprietate distinctă, importantă, a hexokinazelor este gradul lor de inhibare în prezenţa glucozo-6-fosfatului, experimente indicând o valoare mai mare a Km în cazul hexokinazei B cu jumătatea C-terminală.

De ce organismul animal are nevoie de patru izoenzime diferite? Există mai multe răspunsuri posibile. Primul este dat de faptul că izoenzimele sunt localizate diferit în celule, o cantitate importantă (peste 80% în anumite ţesuturi) de hexokinază A găsindu-se în mitocondrii, hexokinaza B de asemenea în mitocondrii iar hexokinaza C fiind localizată la periferia nucleului. O atenţie mai mare a fost acordată parametrilor cinetici, ce diferă considerabil. Hexokinaza C este inhibată de concentraţii crescute de glucoză iar hexokinaza D este activă doar la concentraţii de glucoză mai mari de 1 $mmol^{-1}$ şi prezintă comportament cooperant la concentraţii mai mari, ceea ce corespunde concentraţiei din sânge. Din acest motiv, hexokinazei D i s-a acordat o atenţie mai specială, ea având probabil un rol fiziologic distinct, explicat în continuare.

HEXOKINAZA D

Cu ani în urmă, s-a sugerat faptul că hexokinaza D, datorită afinităţii scăzute faţă de glucoză comparativ cu alte hexokinaze, şi datorită faptului că devine activă doar la anumite concentraţii ale glucozei în sânge, poate avea un rol special în metabolismul glucozei la nivelul ficatului. S-a punctat de asemenea faptul că hexokinaza D, comparativ cu alte izoenzime, prezintă o specificitate mai mare pentru glucoză decât faţă de fructoză, la concentraţii scăzute, din acest motiv deseori fiind numită glucokinază, terminologie pe care o adoptăm şi noi. Totuşi, specificitatea pentru fructoză sau glucoză este dependentă de concentraţia celor două substrate, denumirea de glucokinază fiind câteodată eronată. Comparativ cu cele trei izoenzime este relativ insensibilă la acţiunea de inhibare a glucozo-6-fosfatului. Independent de aceasta, hexokinaza D prezintă o largă răspândire în ţesuturi, genele fiind exprimate doar în hepatocite şi celulele β pancreatice, secretoare de insulină.

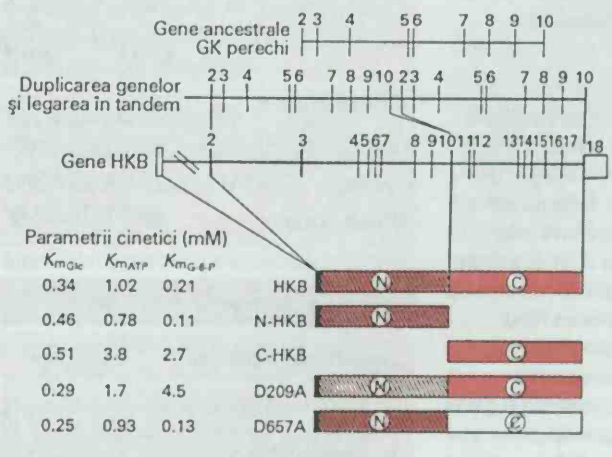


Fig. 6.39. Evoluţia genelor pentru hexokinaza B.

Structura exonului hexokinazei D

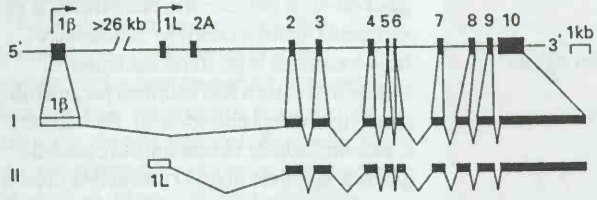


Fig. 6.40. Structura genei hexokinazei D în ficat și celulele β.

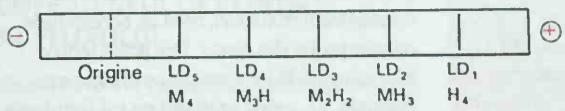
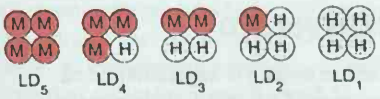


Fig. 6.41. Izoenzimele lactatdehidrogenazei separate prin electroforeză.



6.42. Lactatdehidrogenaza prezintă cinci izoenzime, formate din două subunități

Genele prezintă doi promotori. Transcripția în celulele β este inițiată exclusiv de promotorul din amonte iar în celulele hepatice de promotorul din aval. Organizarea exon- intron a genei umane este prezentată în fig. 6.40, căsuțele pline reprezentând exonii iar săgețile locul inițierii transcripției. Liniile I și II arată cum îmbinarea diferențială a transcripției primare conduce la exoni diferiți în celulele insulare (exon 1β) și ficat (exon 1L). Exonii 2 – 10 sunt aceeași în cele două țesuturi. Genele din ficat sunt reglate hormonal de insulină, scăderea activității glucokinazei hepatice având loc în stările de înfometare și revenind la normal prin alimentarea cu glucoză. Modificări asemănătoare nu au fost evidențiate pentru celulele β. AMP-ciclic (a cărui nivel crește în ficat în prezența glucagonului) exercită un control negativ asupra expresiei genei glucokinazei. Acestea sunt motivele pentru care credem că hexochinaza D are un rol distinct în metabolismul glucozei.

HETEROPOLIMERII

Lactatdehidrogenaza (LDH), ce catalizează interconversia lactatului la piruvat (vezi, de exmplu, p. 123), este un bun exemplu de formare a izoenzimelor prin intermediul heteropolimerilor. După separarea prin electroforeză a unui extract din țesuturi au fost identificate câteva benzi de proteine ce prezintă activitate LDH, acestea fiind prezentate în fig. 6.41. Ele rezultă deoarece în celule sunt prezente două tipuri de subunități încărcate diferit, notate cu H (de la „heart"-inimă) și M (de la „muscles"-mușchi). Acestea au fost notate în acest mod deoarece mușchii inimii dețin cantități mari de unități tetramere formate din patru subunități H, în timp ce mușchii scheletici conțin patru subunități M. Formele intermediare, notate $LD_1 - LD_5$, rezultă din heterotetrameri cu conținut diferit în cele două tipuri de subunități, așa cum este prezentat în fig. 6.42.

VARIANTELE ALELICE ALE ENZIMELOR

În eucariote fiecare individ are cel puțin două gene care codifică o anumită proteină: o alelă moștenită de la părintele mascul și cealaltă de la părintele femelă. Totuși, fiecare dintre acestea poate fi una din formele alelice, așa cum apare în cazul hemoglobinei. Posesia unei forme alelice diferite poate avea consecințe variate pentru individ dacă acestea prezintă proprietăți cinetice diferite. Un astfel de exemplu apare în cazul unor diferite alcool dehidrogenaze. La om, etanolul este metabolizat prin acțiunea a două enzime.

Alcool dehidrogenaza din citosolii hepatici (ADH) formează acetaldehida:

$$CH_3CH_2OH + NAD^+ \rightarrow CH_3CHO + NADH+H^+$$

Acetaldehid dehidrogenaza mitocondrială (ALDH) o transformă în acetat:

$$CH_3CHO + H_2O + NAD^+ \rightarrow CH_3COOH + NADH+H^+$$

Acetatul este apoi transformat în acetil-CoA pentru a putea fi metabolizat în continuare. Multe din efectele neplăcute, toxice, ale consumului în exces de etanol se datorează formării acetaldehidei.

ADH uman este un dimer poligenic, fiind format din trei subunități diferite α, β și γ, fiecare având mai multe subclase. Modul de clasificare a ADH este prezentat în tabelul 6.4.

Modul de distribuire a subunităților în diferite populații este prezentat în tabelul 6.5, acestea formând izoenzime ce diferă prin parametrii cinetici (tabelul 6.6).

Fiecare individ prezintă un anumit număr din aceste izoenzime, așa cum reiese din

Tabelul 6.4 Clasificarea alcool dehidrogenazelor (ADH)

Gene	Alele	Polipeptide
ADH1	ADH_1	α
ADH2	ADH_2^1	β_1
	ADH_2^2	β_2
	ADH_2^3	β_3
ADH3	ADH_3^1	γ_1
	ADH_3^2	γ_2
ADH4	ADH	π
ADH5	ADH_5^4	χ
ADH6	ADH_6	δ, ε

Tabelul 6.5 Frecvența alelelor alcool dehidrogenazelor (ADH) la diferite rase

	β_1 ADH_2^1	β_2 ADH_2^2	β_3 ADH_2^3	γ_1 ADH_3^1	γ_1 ADH_3^2
Albă americană	>95	>5	<5	50	50
Albă europeană	90	10	<5	60	40
Japoneză	35	65	<5	95	5
Afroamericană	85	<5	15	85	15

Tabelul 6.6. Proprietățile cinetice ale alcool dehidrogenazelor din clasa I izoenzime

Constrângere cinetică	Izoenzime					
	$\alpha\alpha$	$\beta 1\beta 1$	$\beta 2\beta 2$	$\beta 3\beta 3$	$\gamma 1\gamma 1$	$\gamma 2\gamma 2$
K_m etanol (mM)	42	0,05	0,94	36	1,0	0,5
V_{max} (U mg^{-1})	0,6	0,23	10,0	7,0	2,2	0,87

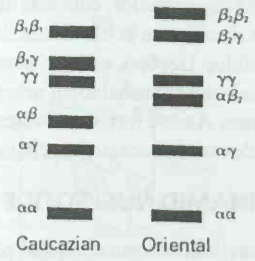


Fig. 6.43. Electroforeza izoenzimelor alcool dehidrogenazei.

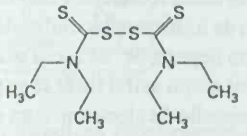


Fig. 6.44. Structura disulfiramului.

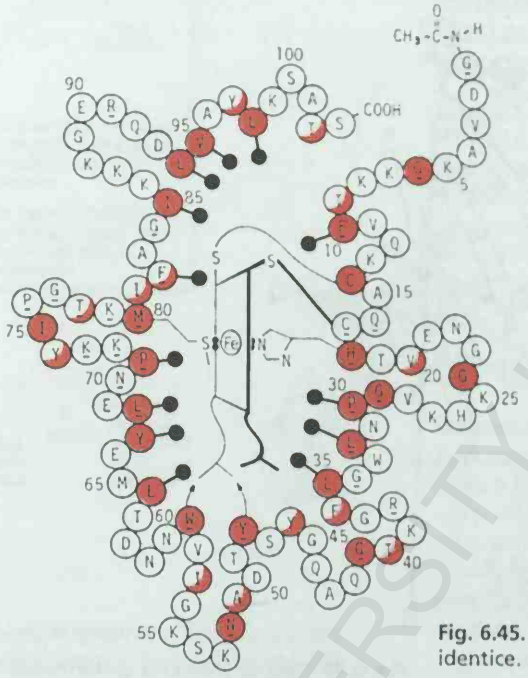


Fig. 6.45. Citocromul c are 26 de resturi identice. Pentru explicaţii vezi textul.

fig. 6.43, ce prezintă distribuţia caracteristică, pe gel-electroforeză, pentru tipul caucazian şi cel oriental.

Proprietăţile cinetice diferite ale enzimelor $\beta 1\,\beta\,2$ şi $\beta 2\beta 2$ conduc la activităţi diferite la pH fiziologic, aşa cum reiese din tabelul 6.6; enzima $\beta 2\beta 2$ este mai activă decât $\beta 1\beta 1$ şi astfel formarea acetaldehidei este mai rapidă.

Tipul caucazian are două izoenzime principale implicate în oxidarea la acetaldehidă, ALDH-1 şi ALDH-2, în timp ce 40% din orientali au doar ALDH-1. Chiar dacă ALDH-2, enzima mitocondrială, are o afinitate crescută pentru substraturi, absenţa sa va duce la creşterea accentuată a concentraţiei de acetaldehidă în subiecţii atipici. ALDH-2 inactivă este probabil principala cauză a efectelor nedorite ale consumului de alcool la orientali, ce poate determina starea de greaţă şi palpitaţii ca răspuns la ingestia, chiar în cantităţi mici, de alcool. Se cunosc numeroşi inhibitori ai ALDH, dintre care desulfiramul (Antabuse) este mai cunoscut (structura în fig. 6.44); aceşti compuşi fiind utilizaţi în terapia adversă la alcoolici, aceştia devenind neplăcut de roşii dacă consumă alcool în timpul terapiei.

SECVENŢA ENZIMEI: CITOCROMUL c

Secvenţa de aminoacizi a citocromului c, enzimă a catenei de respiraţie (vezi p. 125), este cunoscută în cazul a peste 60 de specii diferite, formate de-a lungul evoluţiei organismelor primitive la primatele superioare. Se presupune că aceste secvenţe relevă modul în care modificările apărute de-a lungul evoluţiei au progresat. Ele arată faptul că esenţa structurii proteinei s-a conservat în timpul milioanelor de ani de evoluţie iar modificările resturilor de aminoacizi au avut loc în diverse poziţii din proteină fără însă să modifice funcţia sa esenţială. Anumite resturi de aminoacizi sunt identice pentru toate speciile, deci ele au fost conservate de-a lungul evoluţiei. Sunt 26 de astfel de resturi nemodificate, ele fiind subliniate în fig. 6.45. Resturile în care catena laterală împachetează hemul sunt marcate cu puncte negre, cele în care catena laterală este inclusă complet în interiorul proteinei sunt prezentate ca cercuri roşii iar cele care sunt doar pe jumătate incluse sunt prezentate ca semicercuri roşii. Majoritatea aminoacizilor invariabili sunt incluşi în situsul hemului, incluzând histidina şi metionina, implicate şi în coordinarea Fe^{2+}. Din acest motiv s-a crezut că aceastea au o funcţie unică şi orice mutaţie ce conduce la schimbarea lor poate provoca serioase dezavantaje animalului, afectându-i supravieţuirea.

SECVENŢA ENZIMEI ŞI EVOLUŢIA CONVERGENTĂ: SITUSURILE DE LEGARE A NICOTINAMID NUCLEOTIDEI

Situsul de legare a nicotinamid nucleotidei în multe dehidrogenaze are o structură caracteristică din serii de lanţuri $\beta-$, aşa cum reiese din fig. 6.46. Această figură prezintă structura enzimei glicolitice, gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza, molecula de NAD+ fiind reprezentată în roşu. Lanţurile marcate $\beta A, \beta B, \beta X, \beta \Delta, \beta E$ şi βF sunt importante în crearea situsului. Aranjamente similare au fost evidenţiate în multe enzime ce leagă nicotinamid nucleotide, fiecare dintre aceste proteine având mici secvenţe similare. Toate acestea au condus la ideea că acest tip de situs de legare a evoluat în proteinele ce îşi au originea în puncte mult separate arborele evoluţiei, dând naştere la conceptul evoluţiei convergente – adică, structura proteinelor, iniţial foarte diferite, s-a dezvoltat gradual spre domenii ce converg către tipuri similare de structuri.

DEFECTE GENETICE ALE ENZIMELOR

La ora actuală este recunoscut faptul că multe îmbolnăviri sunt rezultatul unor erori de metabolism . În multe dintre acestea variaţia genetică, adesea rezultat al unei mutaţii, conduce la exprimarea unei proteine a cărei funcţii diferă de cele ale proteinelor recunoscute ca având funcţii normale. Adesea, acestea pot conduce la simptome („overt") de boli. Totuşi, în anumite populaţii, există alte variante ce nu conduc la aceste simptome. Modificările ce nu conduc la apariţia simptomelor se numesc mutaţii de tip silenţios („silent"). Heterozigoţii sunt deseori fără simptome când genele defecte sunt complet compensate de genele normale. Într-o populaţie este posibilă apariţia unui larg spectru de variaţii genetice a oricărei gene particulare, uneori având drept rezultat diferenţe fiziologice ce pot fi recunoscute. Astfel de boli genetice (nu toate enzimatice dar similare în

BUJA GENERAL UNIVERSITY LIBRARY

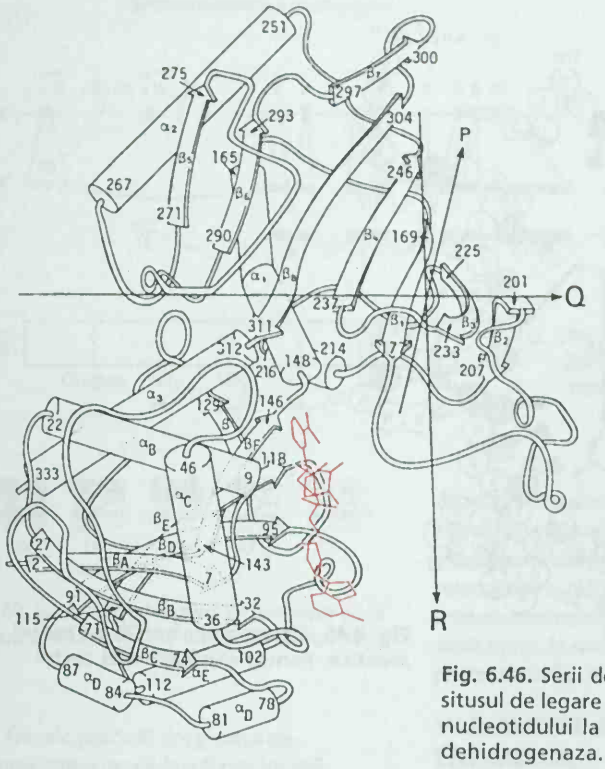


Fig. 6.46. Serii de β-strands ce formează situsul de legare a nicotinamid nucleotidului la gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza.

principiu) sunt anemia falciformă (celulele seceră din hemoglobină) (p. 55), fenilcetonuria (p. 111) şi galactozemia (p. 103).

EFECTUL ALELELOR ÎNTR-O POPULAŢIE

Anumite gene prezintă variaţie alelică astfel încât o populaţie poate fi divizată în grupuri mari de indivizi ce posedă alele diferite. Aceste alele conduc la formarea de proteine cu structuri primare diferite. Cu toate că ele variază doar prin resturile de aminoacizi din una sau două poziţii, funcţia proteinei poate imprima unui grup, ce posedă alele particulare, caracteristici fiziologice distincte faţă de grupul ce posedă alte alele.

În anumite boli, poate exista factorul genetic dar acesta se manifestă doar prin conexiunea cu alţi factori, cum sunt cei de mediu. Astfel de boli includ diabetul (vezi p. 138) şi deseori implică sistemul imun.

COENZIMELE ŞI VITAMINELE HIDROSOLUBILE

ROLUL COENZIMELOR

Încercările timpurii de a purifica enzimele au condus la descoperirea că dializa determină pierderea activităţii ce în multe cazuri este determinată de faptul că anumite componente se pierd când amestecul conţinând enzime este dializat. De exemplu, dacă amestecul este înconjurat de o membrană semipermeabilă, ce permite trecerea doar a moleculelor mici. Dacă partea exterioară a membranei este imersată în soluţie tampon moleculele mici vor trece în această soluţie. Este evident faptul că aceste molecule mici sunt esenţiale pentru activitatea enzimatică şi sunt cunoscute drept coenzime. Termenul de cofactor include astfel de compuşi dar este de asemenea utilizat în descrierea altor molecule, cum sunt ionii metalici necesari uneori activităţii enzimatice, din aceste motiv „coenzime" este termenul general rezervat pentru moleculele organice necesare funcţiei enzimatice. Anumite coenzime, cum sunt nicotinamid nucleotidele, sunt incluse în scrierea reacţilor, apărând ca produşi în forma lor transformată. Din punct de vedere cinetic astfel de molecule sunt tratate ca şi substraturi propriu-zise, spre deosebire de altele, cum este piridoxal-fosfatul (p. 96) ce este privit ca parte esenţială în mecanismul reacţiei enzimatice şi nu ca un substrat. În anumite cazuri coenzimele rămân strâns legate de enzimă, cum este cazul flavin nucleotidelor (p. 94) ce sunt oxidate sau reduse în formă legată de partea proteică a enzimei.

După descoperirea şi identificarea vitaminelor, s-a constatat că multe dintre ele îşi manifestă acţiunea funcţionând drept coenzime. Acest fapt este valabil în cazul vitaminelor hidrosolubile cum sunt B1 şi B6. Alte vitamine sunt necesare în biosinteza coenzimelor, cum este de exemplu riboflavina în biosinteza flavin nucleotidelor. Deseori, anumiţi compuşi pot funcţiona în sensul satisfacerii necesarului de vitamine. Aceste forme echivalente ale vitaminelor sunt cunoscute ca vitameri.

NICOTINAMID NUCLEOTIDE

Multe reacţii biochimice implică procese de oxidare şi reducere. Deseori acestea se desfăşoară prin eliminarea atomilor de hidrogen (de obicei doi) din moleculă, în cazul oxidării, respectiv adiţia de atomi de hidrogen în cazul reducerii. Prin eliminarea unui atom de hidrogen din moleculă rămâne un electron nepereche, de aceea uzual, se elimină doi atomi astfel încât să se poată forma o pereche de electroni, cum este de exemplu formarea legăturii duble. Una din cele mai importante coenzime implicate în transferul atomilor de hidrogen este nicotinamid adenin dinucleotida (NAD^+), a cărei structură este redată în fig. 6.47, precum şi FAD şi FMN. NAD^+ acţionează, în mod normal, prin eliminarea a doi atomi de hidrogen din compusul care este oxidat, dar numai unul dintre aceşti atomi este transferat intact la NAD^+, în poziţia 4 a ciclului nicotinamidic. În cazul celuilalt atom de hidrogen, electronul său este transferat la NAD^+, el neutralizând sarcina pozitivă din poziţia 1 a ciclului nicotinamidic, iar protonul este eliminat în soluţie.

Ecuaţia generală a unei reacţii în care participă NAD^+ este:

$$RH_2 + NAD^+ \rightarrow R + NADH + H^+$$

Pentru simplificare, în scrierea proceselor metabolice, H^+ este deseori omis. Totuşi, este important de reţinut faptul că el este întotdeauna implicat în reacţie. Acelaşi lucru se aplică în cazul $NADP^+$ şi formei sale reduse.

Nicotinamid dinucleotid fosfatul ($NADP^+$) este forma oxidată a coenzimei prezentate, în care hidroxilul de la C-2 al ribozei ataşată nicotinamidei este esterificat la fosfat. Reducerea ciclului nicotinamidic în NADP+ are loc în mod analog cu cea a NAD^+. Aceste coenzime sunt hidrosolubile şi sunt în mod normal eliberate de enzime după reacţie. Nicotinamid nucleotidele pot de asemenea să rămână strâns legate de enzime, având rol în menţinerea structurii acesteia.

O proprietate utilă a acestor coenzime este faptul că spectrele de absorbţie a formelor oxidate şi a celor reduse diferă, absorbţia formei reduse fiind mai mare în regiunea spectrului apropiată de 340 nm (fig. 6. 48). Astfel, multe reacţii de

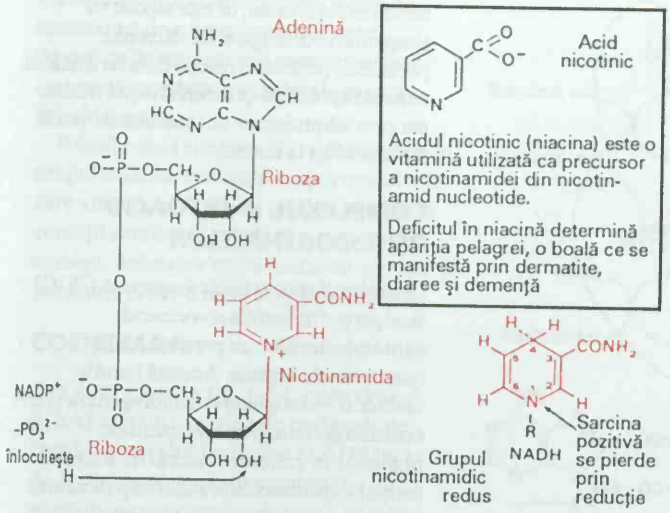


Fig. 6.47. Structura nicotinamid nucleotidei.

dehidrogenare pot fi urmărite prin determinarea absorbanţei la 340 nm.

COENZIMELE ADENIN NUCLEOTIDICE

Adenozin 5'–trifosfatul (ATP), a cărui structură este redată în fig. 6.49, se formează în timpul catenei de respiraţie din adenozin 5' – difosfat (ADP). Această funcţie a respiraţiei are o semnificaţie majoră deoarece ATP este implicat în multe reacţii, nu numai în fosforilări, în care este hidrolizat în ADP şi orto-fosfat. Cantitatea mare de energie liberă negativă asociată cu hidroliza ATP (p.82) face ca multe din aceste reacţii să se desfăşoare în direcţie în care ATP este hidrolizat. Astfel, această reacţie parţială deseori are funcţia de a deplasa reacţiile totale într-o anumită direcţie. Cei trei compuşi, ATP, ADP şi AMP, sunt parte a unui sistem ce reglează cursul anumitor procese, lucru evidenţiat de numeroasele exemple discutate în paginile următoare. Adenilat kinazele (denumirea veche de miokinaze) sunt enzime implicate în reglarea concentraţiei adenin nucleotidelor. Ele catalizează reacţia:

$$ATP + AMP \leftrightarrow 2ADP$$

O altă influenţă majoră în biosinteza ATP îl reprezintă stadiul complet al metabolismului celular şi gradul de utilizare al ATP în acest proces. Catena de respiraţie este reglată de concentraţiile relative ale ADP şi ATP, aşa cum este prezentat la p. 130. Cantitatea cunoscută ca schimb de energie este definită de expresia:

$$\frac{[ADP] + \frac{1}{2}[ADP]}{[ATP] + [ADP] + [AMP]}$$

ATP, ADP şi AMP sunt importanţi reglatori alosterici, în numeroase reacţii, cum este de exemplu reacţia catalizată de fosfofructokinază (p. 122).

SISTEMUL COENZIMELOR NUCLEOTIDICE ÎN REGLAREA METABOLICĂ

În cadrul proceselor metabolice, sistemele ATP/ADP/AMP, NAD+/NADH şi NADP+/NADPH au o funcţie de reglare. Celulele au capacitatea de a regla proporţia între componentele ale sistemelor. După un interval scurt de timp, suma componentelor fiecărui sistem de coenzime:

1 ATP + ADP + AMP
2 NADH + NAD+
3 NADPH + NADP+

este constantă în orice compartiment celular. Dacă unul din componentele oricărui sistem creşte, o face în detrimentul unui alt component; adică, dacă NADH creşte, NAD+ scade sau dacă nivelul ATP se modifică, nivelele ADP sau AMP (sau în anumite situaţii, amândouă) vor suferi modificări compensatorii. Bineînţeles, pe intervale de timp mai lungi, concentraţiile finale ale componenţilor se pot modifica, datorită biosintezei sau degradării lor, dacă condiţiile fiziologice o cer. Concentraţia relativă a componenţilor fiecărui sistem este adesea un parametru ce determină efectul lor alosteric în reglarea activităţii enzimelor.

Concentraţia relativă a acestor coenzime este diferită în diversele compartimente celulare (fig. 6.50); aceasta având un efect direct asupra proceselor metabolice din aceste compartimente. Astfel, în citosoli, apare tendinţa este de transformare a NAD+ în NADH (oxidarea substratului). Din acest motiv, NADPH este deseori coenzima utilizată în reacţiile de reducere din citosol (vezi raportul NADP+ / NADPH în fig. 6.50), un raport favorabil facilitând reducerea.

TIAMIN DIFOSFATUL

Tiamina (vitamina B_1) este precursorul tiamin difosfatului (denumirea veche tiamin

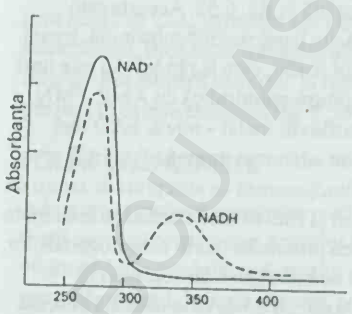


Fig. 6.48. Creşterea absorbanţei la 340 nm poate fi utilizată în determinarea NADH.

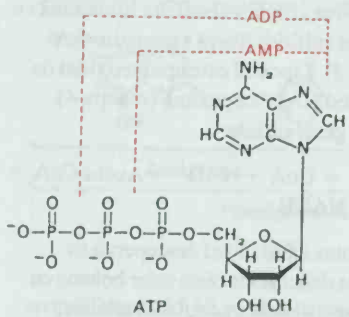


Fig. 6.49. Structura adenin nucleotidei.

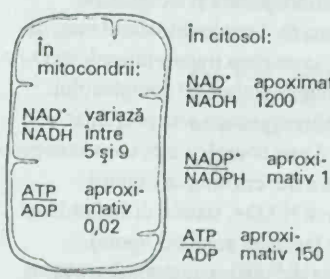


Fig. 6.50. Raportul dintre coenzimele nucleotidice diferă în compartimentele celulare.

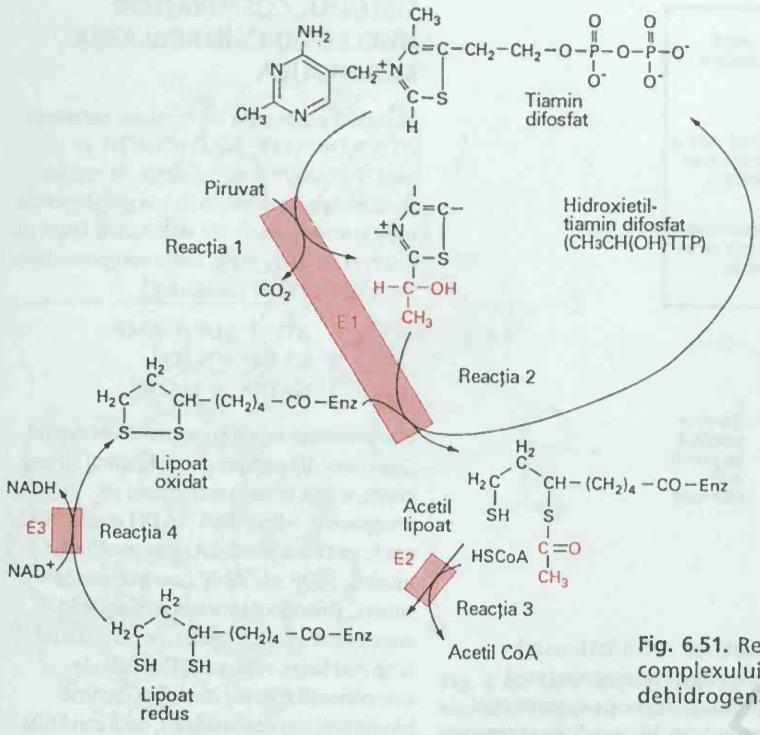


Fig. 6.51. Reacțiile complexului piruvat dehidrogenază.

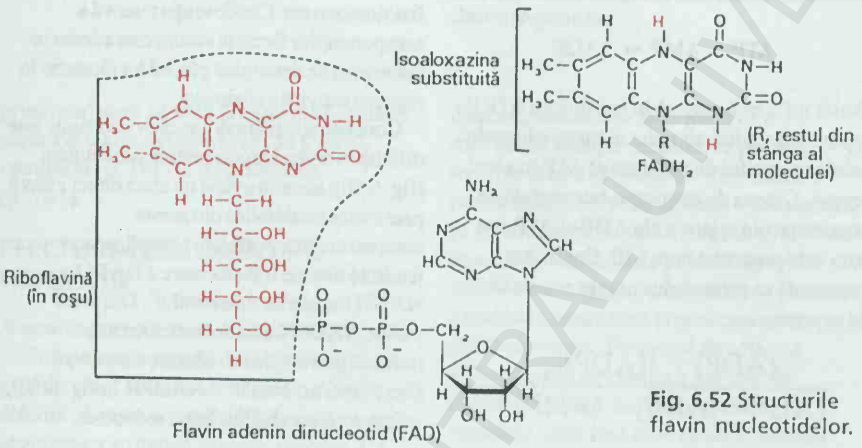


Fig. 6.52 Structurile flavin nucleotidelor.

pirofosfatul) ce este coenzima unor importante reacții de decarboxilare oxidativă.

În decarboxilarea oxidativă, eliminarea CO_2 din α-cetoacid este însoțită de oxidarea aldehidei rezultate la acid. În astfel de reacții sunt incluse și cele catalizate de piruvat dehidrogenază și oxoglutarat dehidrogenază. Tiamin difosfatul este, de asemenea, coenzima transcetolazelor. Mecanismul de acțiune al complexului piruvat dehidrogenază este prezentat în fig. 6.51. Acest complex este constituit prin activitatea a trei enzime, ce implică participarea NAD+, tiamin difosfatului și lipoatului (anionul acidului lipoic). Activitatea enzimelor se desfășoară prin intermediul a trei subunități, notate E1, E2 și E3. Reacția 1 implică decarboxilarea piruvatului și adiția unei grupări hidroxietil la tiamin difosfat, de unde este transferată apoi lipoatului oxidat (reacția 2). În această etapă se realizează conversia grupării hidroxietil, legate de lipoat, la acetil tioester. Reacțiile 1 și 2 sunt catalizate de E1. E2 catalizează formarea acetilCoA prin schimbarea grupării acetil din lipoamidă cu gruparea sulfidril liberă a coenzimei A (reacția 3). Lipoatul este apoi reoxidat de E3, având NAD^+ coenzimă (reacția 4). Reacția generală este:

$$\text{Piruvat} + \text{CoA} + NAD^+ \rightarrow \text{Acetil CoA} + CO_2 + NADH$$

Tiamina a fost inițial descoperită ca vitamina deficitară în dieta celor bolnavi cu beri – beri, o boală a populației asiatice, dependentă de dieta cu orez. Dacă orezul este decorticat, tiamina este îndepărtată. Boala este asociată cu neuropatii și cardiopatii. La animale de laborator se poate induce un deficit experimental, ce este asociat cu simptome neurologice. De exemplu, porumbeii prezintă o reacție caracteristică, ei nefiind capabili să-și mențină capul ridicat, dar prin administrare de vitamină B1 pot fi rapid readuși la normal.

COMPLEXUL α–CETOACID DEHIDROGENAZELOR

Complexul piruvat dehidrogenază (PDC) face parte din familia α–cetoacid dehidrogenazelor ce prezintă același mecanism de acțiune. Această familie include α–cetoglutarat dehidrogenaza și α–cetoacid dehidrogenazele specifice, implicate în scindarea catenei de atomi de carbon a aminoacizilor ramificați (leucina, izoleucina și valina). Toate aceste complexe sunt formate din trei componente catalitice, E1, E2 și E3. Genele specifice pentru E1 și E2 există pentru fiecare complex, pe când componenta E3, ce catalizează aceeași reacție pentru toate trei complexele, este codificată de o singură genă. În piruvat dehidrogenază, componenta E1 este un heterotetramer format din câte două subunități α și β. Kinaza implicată în reglarea enzimei (vezi p. 167) fosforilează trei resturi de serină specifice din subunitatea E1α. Reglarea expresiei genelor este importantă în timpul embriogenezei și diferențierii, dar și în organismele adulte, în ajustarea concentrației enzimei în diferite condiții fiziologice. De exemplu, la șobolani, o dietă bogată în glucoză, determină o creștere a concentrației componentei proteice. Anumiți promotori – regulatori ai PDC – E1α sunt prezentați în fig. 13.17. În total se cunosc șapte domenii de legare a proteinei nucleare împreună cu elementele cis-temporare (vezi p. 167).

FLAVIN NUCLEOTIDE

Flavinadenin dinucleotidul (FAD) și flavin mononucleotidul (FMN) sunt coenzime din clasa dehidrogenazelor, cunoscute ca flavinproteine. Structura FAD este reprezentată în fig. 6.52. Aceasta este formată din izoaloxazină substituită, legată de ribitol fosfat, care la rândul său este unit prin legătură anhidridică cu AMP. FMN este riboflavin fosfat – adică, FAD fără partea de adenozin monofosfat. FAD și FMN funcționează ca acceptori de atomi de hidrogen și sunt în mod normal strâns legate de partea proteică a flavin dehidrogenazelor. Atomii de hidrogen sunt acceptați în pozițiile din ciclul de izoaloxazină desenat cu roșu în fig. 6.52.

Aceștia sunt apoi deplasați la un acceptor, coenzima fiind reoxidată. Procesul este prezentat sumar în fig. 6.53.

Flavincoenzimele rămân strâns legate de apoenzimă de-a lungul reacției, spre deosebire de nicotinamid coenzimele ce se comportă ca substraturi solubile pentru dehidrogenaze.

Riboflavina (vitamina B2) a fost izolată în timpul studiilor efectuate asupra modului în care vitaminele B previn pelagra apărută în condiții similare la șobolani și oameni. La oameni, deficiența apare foarte rar și poate fi prevenită printr-o dietă bogată în porumb.

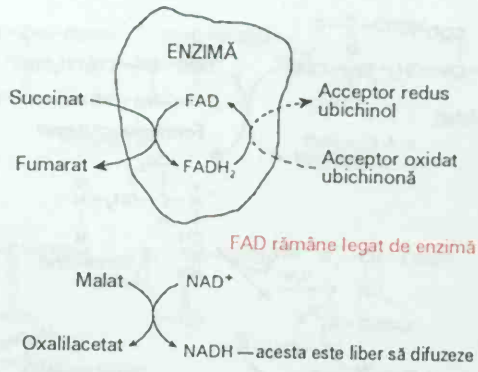


Fig. 6.53. Flavin nucleotidele legate la enzimă.

COENZIMA A

Așa cum apare în fig. 6.54, coenzima A (CoA) este un complex de molecule ce conține derivatul fosforilat al ADP legat de acidul pantotenic (o combinație a acidului pantoic cu β–alanina), care în această formă este legat de produsul de decarboxilare al cisteinei. Unul din cei mai importanți derivați ai CoA rezultă prin legarea grupării tiol de gruparea acetil, cu formarea acetil CoA. CoA funcționează ca un activator al grupării acil, în reacțiile de transfer a acestora, în β-oxidare și în reacțiile ce implică participarea acetil CoA. Gruparea sulfidril (-SH) liberă reacționează cu gruparea carboxil formând tioesterul, care este analog, în anumite moduri, cu esterul format între alcool și gruparea carboxil. Gruparea tioester are proprietăți speciale, rezultate din chimia atomului de sulf. Acesta induce deplasarea electronilor, crescând susceptibilitatea grupării carbonil la diverse reacții (de exemplu, cu grupările nucleofilice conduce la transferul grupării acil). În alte reacții, carbonul metil este activat. O componentă a coenzimei A este acidul pantotenic, o vitamină hidrosolubilă.

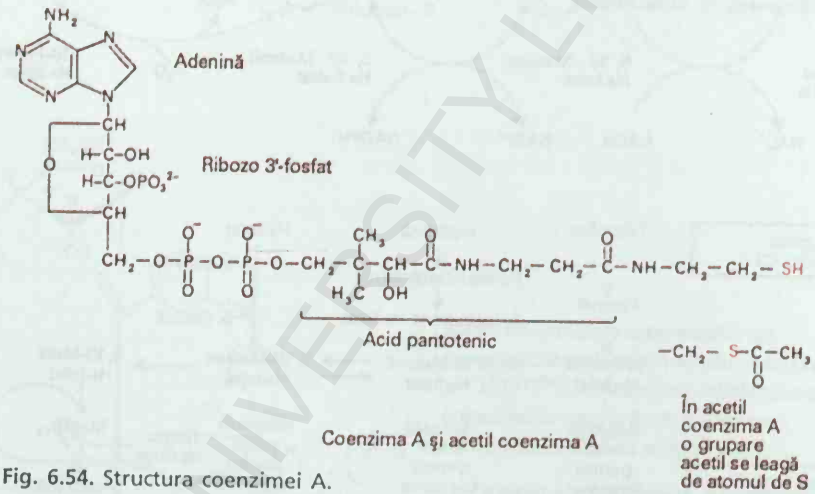


Fig. 6.54. Structura coenzimei A.

BIOTINA

Biotina este o vitamină hidrosolubilă ce funcționează ca grupare prostetică pentru anumite carboxilaze (fig. 6.55). Aceste enzime utilizează ATP în modificarea biotin-enzimei în N-carboxibiotin-enzimă, prin adiția de CO_2, care este apoi transferat substratului. Biotina se leagă covalent, prin intermediul grupării carboxil, la restul lizil prezent în catena enzimei (fig. 6.56).

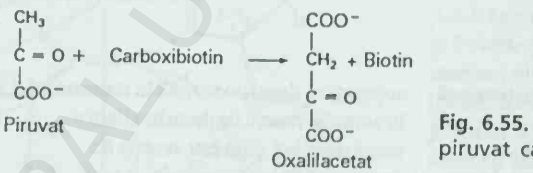


Fig. 6.55. Participarea biotinei la reacția piruvat carboxilazei.

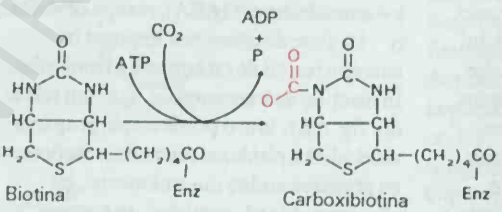


Fig. 6.56. Formarea carboxibiotinei.

FOLAT COENZIMELE

Adeseori, transferul grupărilor metilen sau metil necesită participarea acidului folic, o vitamină hidrosolubilă, și derivatul acestuia, tetrahidrofolatul. În acest derivat, pozițiile 5, 6, 7 și 8 din ciclul pteridic sunt reduse. Diversele componente ale moleculei de acid folic sunt prezentate în fig. 6.57. Tetrahidrofolatul poate reacționa fie cu serina, formând 5,10-metilen-tetrahidrofolat, în care legătura metilen este formată între C-5 și C-10, fie cu formiminoglutamat, un metabolit al histidinei (p. 114), formând 5-formimino-tetrahidrofolat, în care gruparea formimino –CH=NH este transferată la C-5 (vezi Fig. 6.58). Așa cum reiese din figură, aceasta poate fi convertită la alte forme. Fig. 6.59 sumarizează aceste reacții și interconversii și arată procesele în

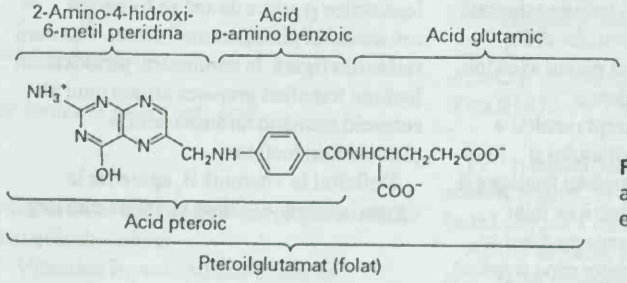


Fig. 6.57. Componentele acidului folic. Folatul este un pteroilglutamat.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

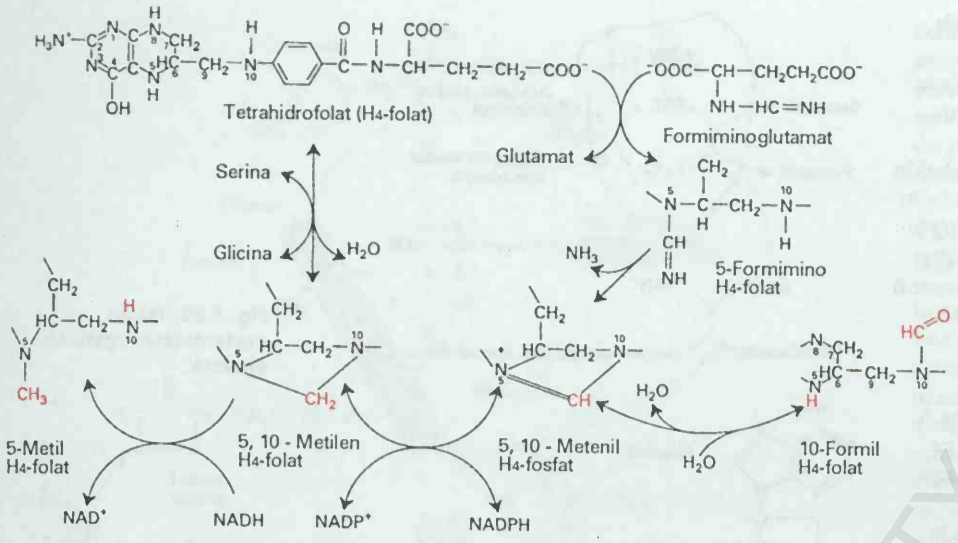


Fig. 6.58. Interconversia coenzimelor folatului.

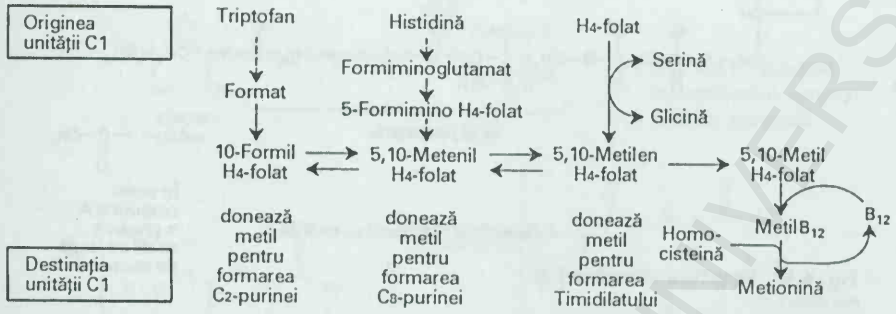


Fig. 6.59. Donarea unei grupări metil de catre coenzimele folatului. Metil B_{12} = metilcobalamina (vezi p. 97).

care derivații tetrahidrofolatului funcționează ca donori de grupări metil.
5-Metil-tetrahidrofolatul este forma circulantă, în care folatul este preluat, în cea mai mare măsură, după absorbție. Aceasta este doar una din reacțiile prin care folatul poate fi format și apoi transformat în alte folat coenzime. Prin reacția cu cobalamina se formează metilcobalamina, care apoi, prin reacție cu homocisteina, poate forma metionina și regenera cobalamina. Este important de reținut că aceasta nu constituie o cale de biosinteză a metioninei; aceasta, ca precursor al homocisteinei, trebuie asigurată prin dietă. În deficiența de vitamină B_{12} (vezi ulterior), aceste reacții nu pot avea loc, scăderea concentrației celulare a folat-coenzimelor având drept rezultat o reducere a biosintezei timidilatului și purinelor. Numeroase anormalități fetale pot fi prevenite prin creșterea preluării de folat înainte de concepție, suplimentarea dietei cu folat fiind recomandată femeilor când stopează contracepția și doresc menținerea sarcinii.

PIRIDOXAL FOSFATUL

Piridoxal fosfatul este un derivat al vitaminei hidrosolubile B6. Piridoxina, piridoxamina și piridoxalul (vezi fig. 6.60) sunt toți „vitameri" ai B_6. Piridoxal fosfatul acționează drept coenzimă în transaminări și în anumite reacții de decarboxilare a aminoacizilor, cum este reacția de decarboxilare a glutamatului la acid γ-aminobutiric (GABA), reacție descrisă la p. 115. Este de asemenea implicat în anumite reacții de racemizare a izomerilor. În reacțiile de transaminare, așa cum reiese din fig. 6.61, într-o primă etapă, gruparea aldehidică a piridoxal fosfatului reacționează cu gruparea amino din aminoacizi, cu eliminare de apă, rezultând un compus numit bază Schiff. Prin rearanjarea legăturilor și adiție de apă se formează cetoacidul și piridoxamin fosfatul. Așa cum reiese din figură, în continuare, piridoxamin fosfatul transferă gruparea amino unui alt cetoacid formând un aminoacid și piridoxamin fosfatul.

Deficitul în vitamină B_6 apare rar la oameni deoarece această vitamină este larg răspândită în alimentele comune și, de asemenea, este biosintetizată în cantități apreciabile de către bacteriile intestinale. S-a presupus că o creștere a vitaminei B_6 preluate poate fi benefică dar, luată în exces, poate avea efecte dăunătoare. Principala anormalitate apărută în deficiența de vitamină B_6 este dermatita, ce poate fi vindecată prin administrare de vitamină. De asemenea, animalele de laborator cu deficit în B_6 sunt susceptibile la convulsii epileptiforme spontane și sunt mai susceptibile la medicamente convulsive ce acționează ca antagoniste GABA.

VITAMINA B_{12}

Vitamina B_{12} a fost izolată, pentru prima dată, sub formă de cianocobalamină, ca fiind implicată în hemoragiile hepatice ce însoțesc simptomele anemiei pernicioase. Patru cicluri pirolice formează o structură

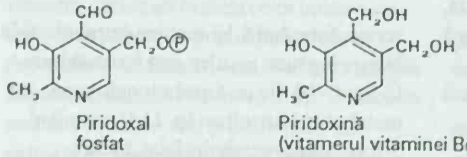


Fig. 6.60. Structurile piridoxal-fosfatului (forma activă a vitaminei B_6) și piridoxinei.

BCU CLUJ UNIVERSITY LIBRARY

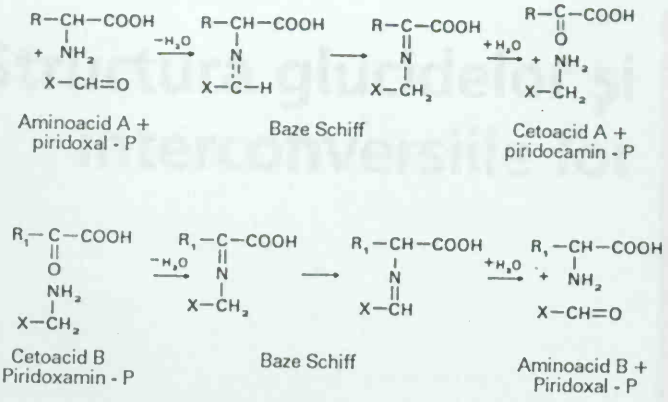
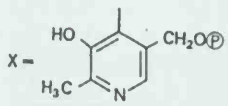


Fig. 6.61. Formarea bazelor Schiff şi rolul lor în mecanismul transaminării.



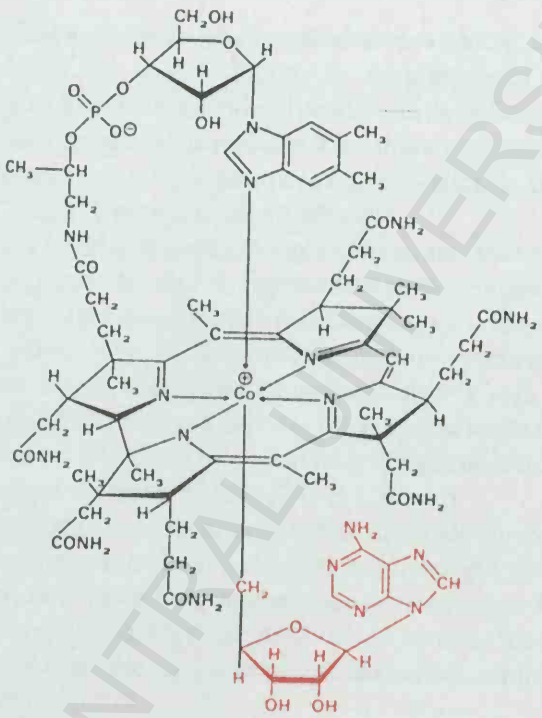
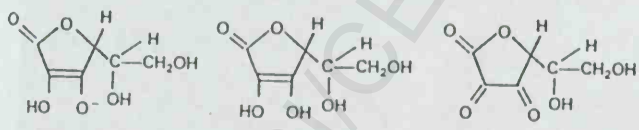


Fig. 6.62. 5'-Deoxiadenozil cobalamina ca formă a vitaminei B_{12}.



6.63. Structurile acidului ascorbic şi a formelor ionizate (ascorbat, acid dehidroascorbic).

asemănătoare porfirinei, în jurul unui atom de cobalt. Atomul de cobalt formează legături coordinative cu alte grupări din moleculă. Cobalamina este denumirea dată structurii prezentate cu negru în fig. 6.62. În această structură, cu roşu, este reprezentată legătura coordinativă prin care gruparea 5'-deoxiadenozil se leagă de atomul de cobalt. Cea de a şasea legătură coordinativă este formată de gruparea cian în cianocobalamină respectiv de gruparea metil în metilcobalamină.

Vitamina B_{12} este prezentă doar în produsele de origine animală, în special în ficat, peşti şi ouă. Deficitul apare rar şi este favorizat de pierderea unui factor intrinsec, ce este o proteină secretată de mucoasa gastrică şi este strict necesară absorbţiei vitaminei. Pierderea acestui factor intrinsec conduce la anemie pernicioasă.

Metilcobalaminele acţionează drept coenzime în metilarea homocisteinei (vezi p. 110) şi 5'-deoxiadenozil cobalamina este coenzimă în reacţia de transformare a metilmalonil-CoA în succinil-CoA.

VITAMINA C (ACIDUL ASCORBIC)

Acidul ascorbic a fost identificat în legumele şi fructele proaspete ce previn boala numită scorbut, caracterizată prin deteriorări ale ţesuturilor ce au ca rezultat sângerarea gingiilor şi pierderea dinţilor. Structura acidului ascorbic şi a formei sale ionizate, ascorbat, sunt redate în fig. 6.63. Acidul ascorbic acţionează ca un agent reducător, fiind oxidat la acid dehidroascorbic. Acţiunea de prevenire a scorbutului poate fi explicată prin implicarea sa în hidroxilarea prolinei, o etapă importantă în biosinteza colagenului. Prolina este oxidată la hidroxiprolină după ce a fost încorporată în precursorul peptidic al colagenului (p. 65). Ecuaţia reacţiei, la care mai participă oxoglutaratul şi oxigenul molecular (O_2) este:

-Pro-Gli- + 2-oxoglutarat + O_2 →
-ProOH-Gli- + CO_2 + sucinat + H_2O

Fe^{++} şi acidul ascorbic sunt necesari în această reacţie, în absenţa lor rezultând o formă atipică a colagenului.

Acidul ascorbic joacă un rol important în inactivarea speciilor reactive de oxigen (vezi p. 131). Aşa cum s-a discutat la p. 64, este important în preluarea ferului. Oamenii se numără printre puţinele animale superioare incapabile să biosintetizeze acidul L-ascorbic, datorită absenţei enzimei L-gulonolactonoxidaza, ce catalizează etapa finală în biosinteza acestei vitamine.

BUCUREŞTI FACULTATEA DE BIOLOGIE LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Structura glucidelor și interconversiile lor

7

Glucidele, cunoscute și sub numele de carbohidrați, includ monoglucidele și derivații lor, care în funcție de lungimea macromoleculei, pot fi oligoglucide sau poliglucide. Glucidele au două funcții distincte și vitale: în primul rând glucidele reprezintă substraturi pentru procesele de oxidare care furnizează energie pentru reacții biosintetice, iar în al doilea rând, glucidele pot fi componente structurale.

Glucoza are o importanță deosebită ca sursă de energie. Ea provine din poliglucide de rezervă, cum sunt amidonul din plante și glicogenul din organisme animale. Glucoza funcționează ca substrat al glicolizei, unul dintre cele mai importante procese oxidative generatoare de energie.

Numeroase glucide, printre care manoza, galactoza, fucoza, și derivații lor cu grupări amino sau sulfat sunt componente ale unor poliglucide cu rol structural și joacă un rol important în funcția de recunoaștere și adeziune celulară (a se vedea în capitolele următoare).

Monoglucidele formează o clasă de molecule izomere ce se deosebesc prin configurația grupărilor hidroxil și prin poziția grupării carbonil. Hexozele au șase atomi de carbon, iar pentozele au cinci atomi de carbon. Aldozele au gruparea carbonil la un atom de carbon terminal (de exemplu, o grupare aldehidică), iar cetozele au gruparea carbonil la interiorul catenei (o grupare cetonică).

B.C.U. "M. EMINESCU" IAȘI
BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

MONOGLUCIDE ŞI DIGLUCIDE

STRUCTURA MONOGLUCIDELOR

Glucidele (cunoscute şi sub numele de carbohidraţi) se găsesc sub formă de monoglucide sau ca şi polimeri ce au ca unităţi structurale monoglucide. Monoglucidele sunt compuşi polihidroxilici, cu trei până la zece (sau chiar mai mulţi) atomi de carbon şi care conţin fie o grupare aldehidică (numiţi aldoze) fie o grupare cetonică (în acest caz poartă numele de cetoze). Monoglucidele conţin centre de asimetrie şi de aceea sunt molecule chirale (a se vedea p. 9). De exemplu glucoza, care este larg răspândită ca şi monoglucidă sau ca şi componentă a unor molecule mai mari, există în două forme: D-glucoză şi L-glucoză (a se vedea fig. 7.1.). Configuraţia atomului de carbon 5 (notat C-5) determină încadrarea în seria D sau L a moleculei şi este în relaţie cu configuraţia aldehidei D- sau L-glicerică. Cele două molecule de glucoză sunt în relaţia de obiect – imagine în oglindă, iar configuraţia tuturor grupărilor hidroxil este inversată similar între cele două molecule, în proiecţia Fischer utilizată în figură. Proiecţia Fischer este o reprezentare bidimensională a structurii tridimensionale, şi are ca şi convenţie faptul că legăturile reprezentate orizontal sunt privite ca şi proiecţii înspre spatele hârtiei iar legăturile reprezentate vertical sunt privite ca ieşind din planul hârtiei în sus (fiecare atom de carbon fiind considerat separat). Configuraţia fiecărui atom de carbon poate fi notată cu *R* şi *S*, (a se vedea p. 9) această notaţie aplicându-se fiecărui atom de carbon şi nu întregii molecule. În organismele mamiferelor glucidele se găsesc predominant sub forma D. Monoglucidele cu şase atomi de carbon poartă numele de hexoze iar cele cu cinci atomi de carbon sunt numite pentoze.

Forma aciclică a monoglucidelor se află în echilibru cu forma ciclică, aşa cum se poate vedea în fig. 7.2. Ciclizarea se realizează prin formarea unei legături semiacetalice între gruparea carbonil şi o grupare hidroxil (într-un acetal, două grupări hidroxil sunt legate la o grupare carbonil, într-un semiacetal este implicată doar o grupare hidroxil). Prin ciclizare pot lua naştere două configuraţii, una α sau una β, aşa cum se vede în fig. 7.3. Formele α şi β sunt în echilibru şi interconvertibile prin intermediul formei aciclice. Glucidele care diferă numai prin configuraţia legăturii semiacetalice poartă numele de anomeri iar atomul de carbon ce poartă gruparea hidroxil implicată poartă numele de carbon anomeric. Trebuie observat că, în configuraţia α, hidroxilul anomeric este proiectat spre ciclu din partea opusă faţă de C-6 în timp ce în configuraţia β, el este proiectat de aceeaşi parte a ciclului ca şi C-6. Structurile ciclice care se formează pot fi piranozice, dacă ciclul este format din şase atomi, sau furanozice, dacă ciclul este format din cinci atomi. Monoglucidele care diferă doar prin configuraţia unui atom de carbon, altul decât carbonul anomeric, sunt numite epimeri. Structurile galactozei şi manozei, doi epimeri ai glucozei, sunt prezentate în fig. 7.4. În aceeaşi figură sunt reprezentate structurile a două pentoze şi a unei cetoze importante – fructoza – în forma piranozică.

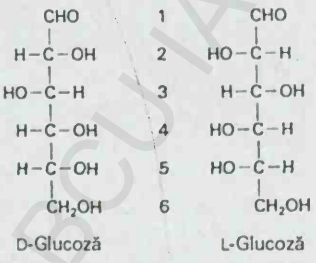


Fig. 7.1. Glucoza prezintă izomeri optici. D-Glucoza este uneori denumită dextroză.

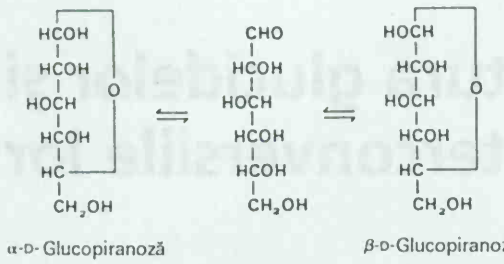


Fig. 7.2. Formele α şi β ale monoglucidelor sunt în echilibru.

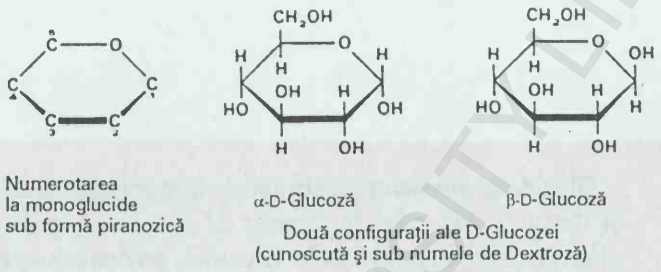


Fig. 7.3. Structura ciclică a monoglucidelor şi numerotarea atomilor în ciclu.

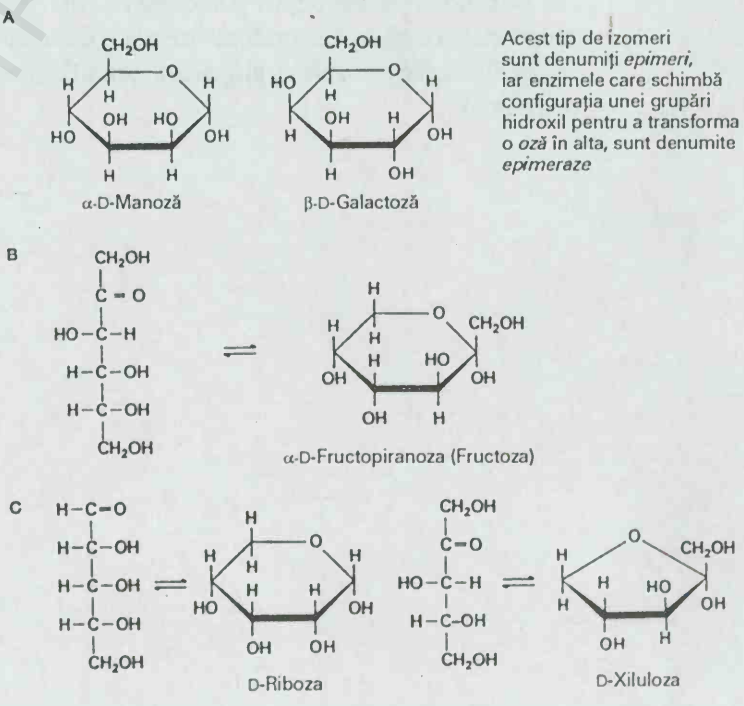


Fig. 7.4. Structura altor monoglucide.

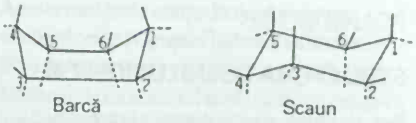


Fig. 7.5. Conformaţiile „barcă" şi „scaun".

Gruparea semiacetalică reacţionează cu uşurinţă cu anumiţi agenţi oxidanţi cum ar fi soluţia Fehling. Această reacţie stă la baza binecunoscutului „test de reducere" a glucidelor care posedă grupare semiacetalică liberă, cum sunt glucoza sau manoza, care reduc reactivul Fehling. Unele diglucide (a se vedea mai jos) posedă grupare semiacetalică liberă. O excepţie importantă este zaharoza (fig. 7.9.), în care monoglucidele constituente sunt legate prin atomii de carbon anomerici. Ca şi consecinţă zaharoza nu este oxidabilă şi nu dă testul de reducere pozitiv.

O structură ciclică formată din şase atomi poate adopta fie o conformaţie scaun fie o conformaţie barcă, aşa cum se prezintă în fig. 7.5. pentru ciclohexan. Legăturile perpendiculare pe planul moleculei se numesc axiale iar cele aflate în planul moleculei se numesc ecuatoriale. Forma ciclică piranozică a D-glucozei adoptă conformaţia scaun (fig. 7.6.)

GLICOZIDE

Monoglucidele pot forma mai mulţi derivaţi. Unii dintre cei mai cunoscuţi derivaţi, glicozidele, se formează prin reacţia dintre hidroxilul semiacetalic şi o grupare hidroxil a unui alcool. Aceasta este ilustrată în fig. 7.7. pentru reacţia dintre D-glucoză şi metanol. Pentru a preciza numele monoglucidei implicate pot fi utilizate denumirile specifice de glucozide, manozide sau galactozide. O glicozidă va avea fie configuraţie α fie configuraţie β, în funcţie de specificitate enzimelor care catalizează formarea lor. Formele α şi β nu sunt interconvertibile în mod spontan odată ce legătura glicozidică a fost formată. Enzimele care scindează glicozidele se numesc glicozidaze şi sunt specifice pentru formele α sau β.

AMINOGLUCIDE ŞI DERIVAŢI SULFURICI

Una dintre grupările hidroxil ale monoglucidelor, cel mai frecvent cea din poziţia C-2, poate fi înlocuită cu o grupare amino care este frecvent acetilată (fig. 7.8.). Aceste aminoglucide se găsesc în poliglucidele complexe, în glicoproteine şi proteoglicani, în care grupările hidroxil pot fi deasemenea sulfurilate (a se vedea, de exemplu p. 102). Glucide sulfurilate se găsesc şi în glicolipide (p. 174).

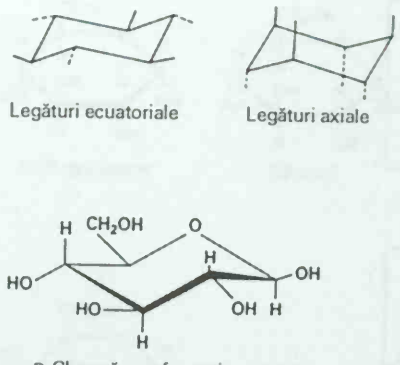


Fig. 7.6. Conformaţia scaun a D-glucozei.

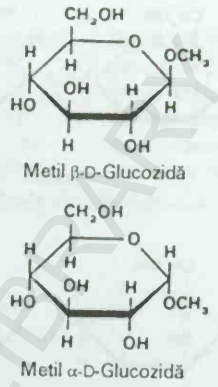


Fig. 7.7. Metilglicozidele D-glucozei.

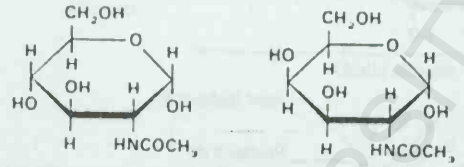


Fig. 7.8. Aminoglucide N-acetilate.

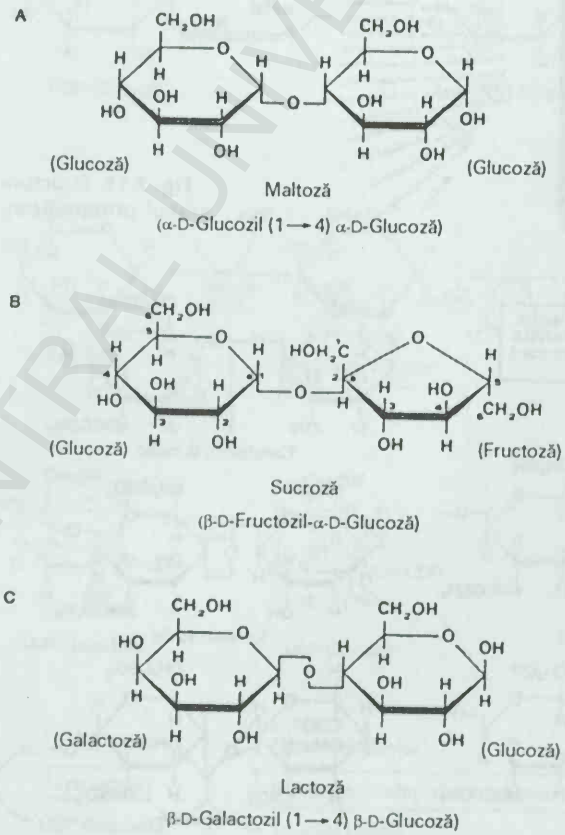


Fig. 7.9. Structurile maltozei, zaharozei şi lactozei.

DIGLUCIDE

O diglucidă este formată din două monoglucide legate printr-o legătură glicozidică. Structurile câtorva diglucide importante sunt prezentate în fig. 7.9. Lactoza este diglucida care se găseşte în lapte şi este alcătuită dintr-o moleculă de galactoză legată glicozidic de hidroxilul de la C-4 al glucozei. Galactoza este în configuraţie β iar legătura se numeşte legătură glicozidică β1-4. Metodologia de nomenclatură este indicată în figură. Se poate utiliza şi o formă abreviată de nomenclatură, aşa cum se indică la p. 180. Maltoza este o diglucidă care se formează frecvent prin hidroliza unor polimeri ai glucozei, cum este amidonul. Zaharoza, îndul-

IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

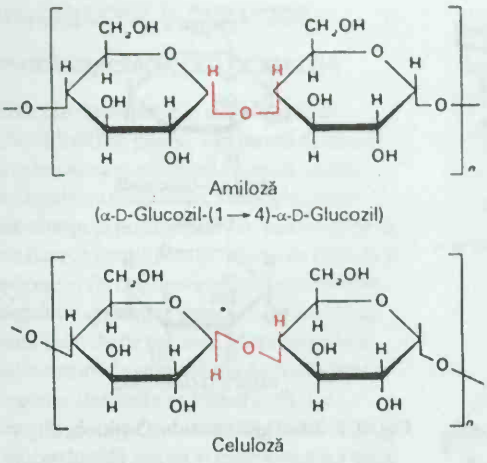
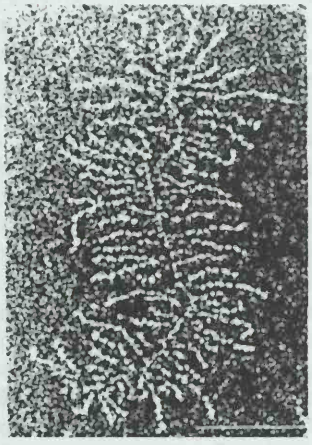


Fig. 7.10. Structurile amilozei și celulozei.



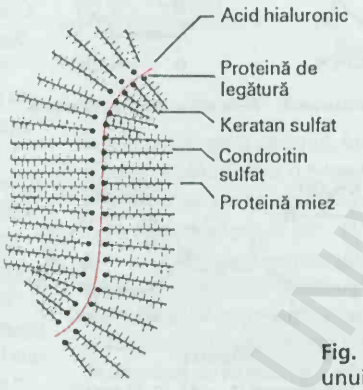
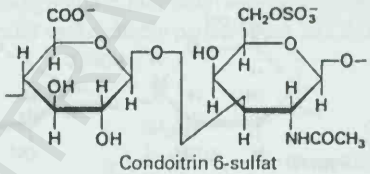
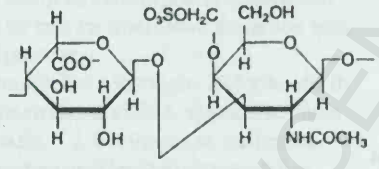
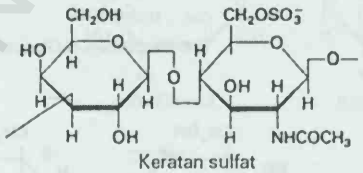


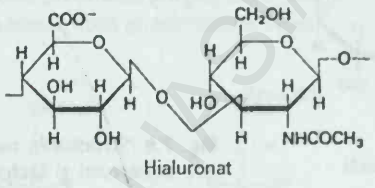
Fig. 7.11. Structura unui proteoglican.

Anticoagulantul heparină leagă antitrombina. Complexul inhibă enzimele cascadei de coagulant a sângelui.









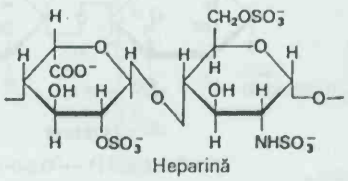


Fig. 7.12. Structurile unor poliglucide complexe.

citorul obținut din trestia de zahăr, este neobișnuită prin aceea că se formează prin legarea a două grupări hidroxil semiacetalice provenind de la cele două monoglucide constituente și în consecință, nu posedă grupare semiacetalică liberă.

POLIGLUCIDE

STRUCTURA POLIGLUCIDELOR

Poliglucidele sunt polimeri ai căror unități structurale sunt monoglucidele. Pentru un număr de unități monoglucidice cuprins între 1-10, se folosește mai degrabă termenul de oligoglucide decât de poliglucide. Unele poliglucide au rol de compuși de rezervă, cele mai reprezentative exemple fiind glicogenul (p. 134) și amidonul (care este alcătuit dintr-un amestec de amiloză și amilopectină) (p. 143). Alte poliglucide au rol structural, structuri foarte diverse și sunt frecvent denumite ca glucide complexe. Catenele de bază ale glicogenului, amilopectinei și amilozei sunt formate din molecule de glucoză legate α1-4 glicozidic. În glicogen și amilopectină apar suplimentar și legături α1-6 glicozidice, care creează ramificări ale catenei (p. 145). În poliglucidele structurale se întâlnește o mare varietate de legături. Majoritatea implică o legătură glicozidică, diferențele dintre o legătură sau alta provenind de la diferitele grupări hidroxil la care se leagă gruparea semiacetalică și de la configurația α sau β a legăturii. Pentru poliglucide se mai utilizează și denumirea de glicani. Dacă glicanul este alcătuit dintr-un singur tip de monoglucidă, el poate fi denumit specific prin înlocuirea terminației „oză" a monoglucidei, cu sufixul „an". Astfel amidonul, care conține numai glucoză, va fi denumit glucan. Structurile amidonului și celulozei (un constituent important al peretelui celular al celulei vegetale) sunt prezentate în fig. 7.10. Organismul uman nu poate digera celuloza deoarece nu poate hidroliza legăturile glicozidice β1-4. Cu toate acestea, celuloza este degradată de către bacterii în stomacul rumegătoarelor, care, în acest fel pot utiliza celuloza ca substanță nutritivă.

GLICOPROTEINE ȘI PROTEOGLICANI

Glucidele se găsesc atașate la multe proteine globulare care din acest motiv sunt clasificate ca și glicoproteine. Termenul de proteoglican este utilizat pentru a denumi anumiți complecși ai glucidelor și proteinelor care se găsesc în mod special în glicocalixul care înconjoară celulele, în fluidul sinovial din articulații ca și în membrane bazale.
fig. 7.11 prezintă o imagine electron-microscopică împreună cu o explicație a structurii unei molecule izolată din cartilagiu de bovină. Această structură este tipică pentru structura proteoglicanilor. Glucidele sunt atașate proteinei centrale („core protein") care este legată de acidul hialuronic prin proteina de legătură. fig. 7.12 prezintă unitățile diglucidice repetitive din care sunt compuse poliglucidele ce se găsesc frecvent în astfel de substanțe.

BCU IMOCENTRAL UNIVERSITY

Aceste molecule conţin în mod obişnuit aminoglucide şi grupări hidroxil sulfurilate fiind frecvent denumite glicozaminoglicani. Moleculele de acest fel sunt încărcate negativ, în parte datorită grupărilor sulfat dar şi datorită grupărilor carboxil ale acidului glucuronic pe care unele dintre ele îl conţin. Fig. 7.13 redă, pentru comparaţie, structura acidului glucuronic alături de structura acidului gluconic. Acidul glucuronic se formează prin oxidarea la atomul de carbon C-6 al glucozei, în timp ce acidul gluconic este produsul oxidării la C-1. Acidul glucuronic joacă un rol important în glucuronide, după cum este explicat la p. 104.

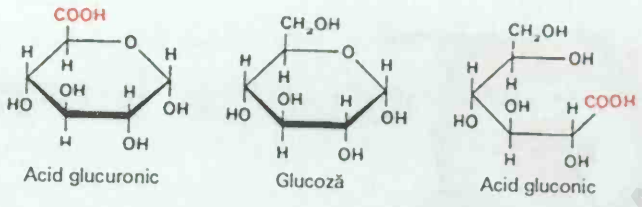


Fig. 7.13. Acidul glucuronic o grupare carboxil la C-6 iar acidul gluconic are gruparea carboxil la C-1.

INTERCONVERSIILE MONOGLUCIDELOR

IMPORTANŢA INTERMEDIARILOR NUCLEOTIDE-GLUCIDE

Anumiţi compuşi în care monoglucidele sunt legate de nucleotide difosforilate sunt importanţi pentru metabolismul glucidelor. Unul dintre aceştia este uridin difosfoglucoza (UDPG), prezentată în fig. 7.14. UDPG se formează enzimatic prin reacţia între UTP şi glucozo-1-fosfat. Compuşi similari ca: uridin difosfogalactoză, guanozin difosfomanoză şi guanozin difosfofucoză, se formează prin reacţii între nucleotidele trifosforilate corespunzătoare şi esteri fosforici ai ozelor la C-1. Acidul UDP-glucuronic se formează din UDP-glucoză prin oxidarea grupării hidroxil de la C-6 la grupare carboxil (fig. 7. 15).

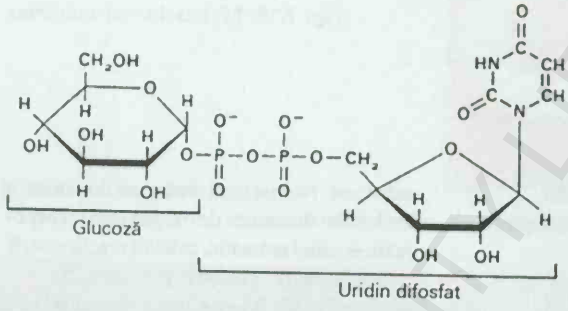


Fig. 7.14. Uridin difosfoglucoza este un intermediar în multe dintre transformările glucozei.

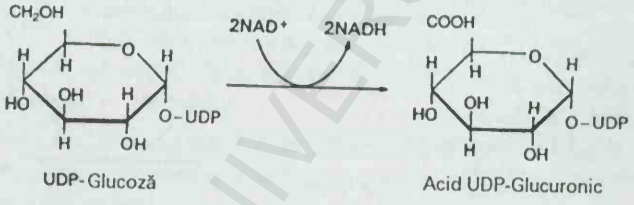


Fig. 7.15. UDP-glucoza este precursor al UDP-glucuronatului.

METABOLISMUL GALACTOZEI

Galactoza este componentă a catenei oligoglucidice din glicoproteine, proteoglicani şi glicolipide. Este de asemenea componentă a lactozei, diglucida din lapte. Prima etapă în metabolismul lactozei este formarea galactozo-1-fosfatului, sub acţiunea unei kinaze specifice numită galactokinaza. Astfel galactoza reacţionează cu UTP şi formează UDP-galactoza (fig. 7.16). UDP-galactoza şi UDP-glucoza suferă interconversii sub acţiunea unei epimeraze (fig. 7.17). UDP-galactoza se poate forma şi sub acţiunea UDP-glucozo-hexozo-1-fosfat uridil transferază (uridil transferază) care catalizează reacţia galactozo-1-fosfatului cu UDP-glucoza, rezultând un ciclu reversibil prezentat în fig. 7.18.

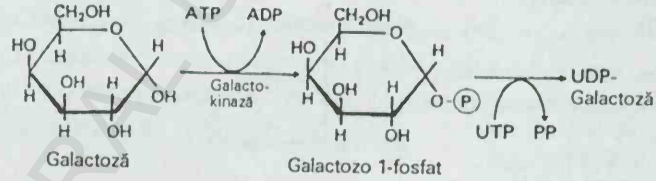


Fig. 7.16. Galactoza este transformată în UDP-galactoză.

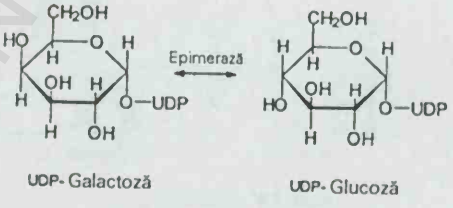


Fig. 7.17. UDP-galactoza şi UDP-glucoza pot epimeriza.

Fig. 7.18. Galactozo-1-fosfat uridil transferaza interconverteşte galactozo-1-fosfatul şi glucozo-1fosfatul şi derivaţii lor cu UDP.

În galactozemie, o deficienţă congenitală de metabolism, sugarul prezintă tulburări de creştere, iar în lipsa unui tratament pot apărea afecţiuni hepatice, boli mintale, cataractă şi leziuni ale tubilor renali, datorate nivelului ridicat al galactozei în ţesuturi. În această afecţiune, poate fi deficientă galactokinaza şi aceasta duce la o formă blândă a bolii, sau poate exista o deficienţă a uridil transferazei. Dacă uridil transferaza este absentă în perioada copilăriei, nu se poate face conversia galactozo-1-fosfatului la UDP-galactoză, deoarece, aşa cum se arată în fig. 7.16., enzima ce formează UDP-galactoza nu se exprimă decât mai târziu, în cursul vieţii.

La adulţi, toxicitatea galactozei este mai puţin severă datorită metabolizării galctozo-1-fosfatului de către UDP-glucozo pirofosforilază care acceptă ca substrat galactozo-

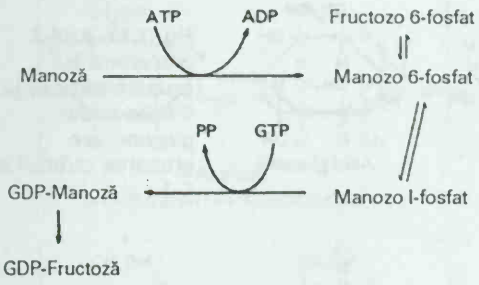


Fig. 7.19. Metabolismul manozei.

l-fosfat în loc de glucozo-1-fosfat. Galactozemia se tratează prin excluderea galactozei din alimentație

METABOLISMUL MANOZEI

Manoza poate fi fosforilată la manozo-6-fosfat, care se mai poate forma alternativ din fructozo-6-fosfat (fig. 7.19).
Manozo-6-fosfatul poate fi converti la manozo-1-fosfat, acesta poate trece în GDP-manoză care, la rândul ei, se poate transforma în GDP-fucoză. GDP-manoza şi GDP-fucoza sunt intermediari în formarea glucidelor complexe.

FORMAREA ACIDULUI N-ACETILNEURAMINIC (ACID SIALIC, vezi p. 179)

Acidul sialic este un constituent important al multor glucide complexe, cum sunt gangliozidele. El este sintetizat prin N-acetilmanozamin-6-fosfat iar atomii de carbon suplimentari sunt adăugați din fosfoenolpiruvat, printr-o succesiune de reacții.
N-Acetilmanozamin-6-fosfatul se biosintetizează din fructozo-6-fosfat printr-o serie de reacții schițate în fig. 7.20.

FORMAREA GLUCURONIDELOR

Compușii care nu sunt foarte solubili în apă nu sunt excretați cu ușurință dar ei pot fi făcuți mai solubili prin metabolizare. Un astfel de mecanism implică legarea acidului glucuronic, prin legătură glicozidică, cu compuși ce conțin grupări hidroxil, așa cum se arată în fig. 7.21. În unele cazuri, este posibil ca grupările hidroxil să fi fost introduse într-un ciclu aromatic de către enzime numite monooxigenaze, care catalizează reacții ca:

$$RH + O_2 + NADPH + H^+ \rightarrow ROH + H_2O + NADP^+$$

Acest tip de enzime se găsesc în reticulul endoplasmic neted şi sunt membre ale unei mari familii de monooxigenaze, familia citocromului P450. Diferiții reprezentanți ai acestei familii sunt specifici pentru anumite substrate. Numai unul dintre cei doi atomi ai moleculei diatomice de oxigen este încorporat în nucleul aromatic, celălalt reacționează cu doi atomi de hidrogen, proveniți din oxidarea NADPH, pentru a forma apa.
Fenobarbitalul determină o proliferare a reticulului endoplasmic al ficatului, de aceea una dintre manifestările administrării acestui medicament este creşterea cantității de enzime cu citocrom P450.
Enzimele care hidrolizează legătura glicozidică a glucuronidelor manifestă, ca şi alte glicozidaze, specificitate pentru configurația α sau β a legăturii glicozidice, fiind cunoscute ca β-glucuronidaze şi α-glucuronidaze.

ALTE CĂI DE DETOXIFIERE

Formarea glucuronidelor nu este singura cale prin care moleculele potențial toxice sunt detoxifiate. Unii compuşi, cum sunt acizii, sunt conjugați cu glicocol, aşa cum este prezentat în fig. 7.22, rezultând conjugați ai glicocolului care sunt mai uşor excretați decât compuşii ca atare. Alți compuşi se conjugă cu gruparea tiolică a glutationului şi formează conjugați cunoscuți ca acid mercapturic.

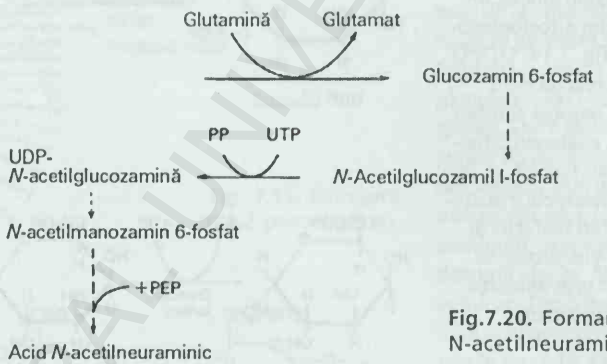
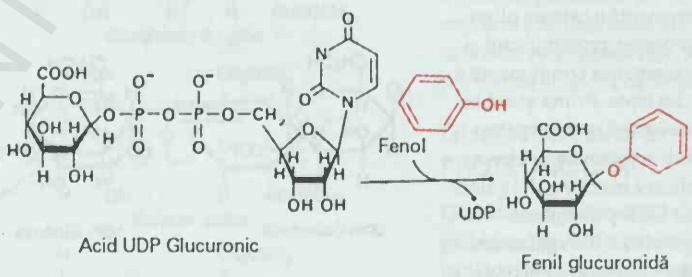


Fig.7.20. Formarea acidului N-acetilneuraminic din fructozo-6-fosfat.



o glicozidă a acidului glucuronic este o

glucuron ....idă

Fig. 7.21. Formarea glucuronidelor.

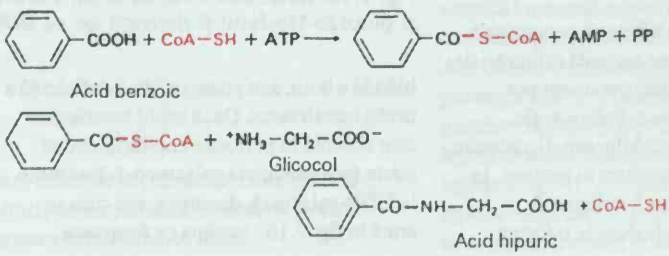


Fig. 7.22. Formarea acidului hipuric.

Metabolismul azotului

8

În organism proteinele se află într-o continuă transformare, fiind biosintetizate şi degradate continuu. Prima etapă în degradarea aminoacizilor implică îndepărtarea grupării amino sub acţiunea unei transaminaze. În ciclul ureogenetic are loc excreţia azotului aminic, sub formă de uree. Există, de asemenea, căi de îndepărtare a catenei hidrocarburice reziduale.

Anumiţi aminoacizi se pot biosintetiza în organismele animale prin transferarea grupării amino (transaminare) pe un cetoacid disponibil. Aminoacizii biosintetizaţi pe această cale sunt aminoacizi neesenţiali, iar cei care nu se pot biosintetiza, ci sunt preluaţi din dietă, sunt cunoscuţi sub numele de aminoacizi esenţiali.

Sunt descrise, de asemenea, procesele de biosinteză a unor compuşi biologici importanţi cum sunt tiroxina, histamina şi adrenalina, precum şi biosinteza hemului. Mai este prezentată creatina, obţinerea acesteia din aminoacizi şi rolul ei ca sursă de energie în muşchi.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CATABOLISMUL PROTEINELOR ŞI ELIMINAREA AZOTULUI

TRANSAMINAREA

In catabolismul proteinelor, unul din obiectivele cele mai importante este îndepărtarea şi eliminarea atomilor de azot. Aceasta are loc după hidroliza proteinelor în aminoacizii constituenţi, sub acţiunea peptidazelor. Dacă intensitatea catabolismului din întreg organismul depăşeşte biosinteza, într-o anumită perioadă, se spune că animalul se găseşte într-o balanţă negativă a azotului, deoarece eliminarea acestuia depăşeşte formarea sa. În caz contrar, la animalele în creştere, apare o balanţă pozitivă a azotului, iar balanţa perfectă între cele două procese este cunoscută drept echilibru al azotului.

În cazul în care necesarul de aminoacizi al organismul este deja satisfăcut, excesul de azot aminic este eliminat sub formă de uree. Grupările amino sunt transferate la aspartat şi glutamat care, aşa cum se va explica ulterior, acţionează ca substraturi în reacţiile ce conduc la preluarea azotului aminic în uree. Transferul unei grupări amino de la un aminoacid la un α-cetoacid, pentru a forma un nou aminoacid, este catalizat de enzime numite transaminaze, într-o terminologie mai specifică fiind denumite amino-transferaze. În cazul glutamatului, gruparea amino poate fi îndepărtată direct, sub acţiunea glutamat dehidrogenazei, enzimă ce catalizează deaminarea oxidativă (fig. 8.1).

În fig. 8.2 este redată ecuaţia generală a reacţiei de transaminare. Mecanismul presupune participarea piridoxal fosfatului şi a fost descris la p. 97. Transaminaze individuale există pentru toţi aminoacizii comuni dar sunt doi cetoacizi, oxoglutaratul şi piruvatul, ce prezintă o importanţă deosebită ca acceptori ai grupării amino. Termenul „oxo" este utilizat în terminologia chimică în desemnarea grupării ceto. Prin transaminarea oxoglutaratului şi piruvatului se obţine glutamat respectiv alanină. Există de asemenea o transaminază importantă pentru care glutamatul sau alanina pot funcţiona ca substraturi, cetoacizii corespunzători acţionând tot ca substraturi, aşa cum reiese din fig. 8.3. Eliminarea grupărilor amino este dependentă de formarea ureei, în ciclul ureogenetic, ciclu ce va fi descris mai jos. Azotul intră în acest ciclu fie ca amoniu, fie prin transfer de la aspartat (termenul amoniu este utilizat pentru a indica suma NH_3 şi NH_4^+. Amoniacul liber sau ionii amoniu reprezintă denumirea specifică a fiecăruia). Multe transaminaze transferă gruparea amino de la un aminoacid la oxoglutarat pe două căi, direct (fig. 8.4) sau indirect prin alanil transaminază (fig. 8.5).

Există, de asemenea, transaminaze ce transferă grupările amino direct la oxalilacetat (fig. 8.6) rezultând aspartatul. În plus, aspartat transaminaza transferă gruparea amino a glutamatului la oxalilacetat pentru a forma aspartatul (fig. 8.7). Astfel, colaborarea dintre aceste enzime orientează grupările amino spre ciclul ureogenetic, aşa cum este prezentat schematic în fig. 8.7. Această figură prezintă, de asemenea, formarea ionilor amoniu din amine sub acţiunea monoamioxidazei (fig. 8.8), enzimă cu rol important în degradarea unor compuşi cum sunt adrenalina şi noradrenalina.

CARBAMILFOSFAT SINTETAZA

În concentraţii mai mari de 50μM, amoniu este toxic pentru sistemul nervos central, fiind astfel esenţială menţinerea concentraţiei în limite scăzute. Prin degradarea resturilor

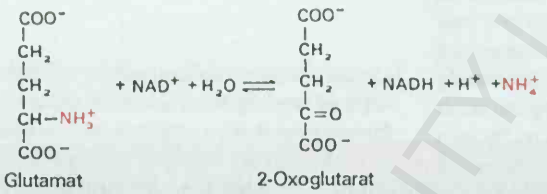


Fig. 8.1. Reacţia catalizată de glutamatdehidrogenază.

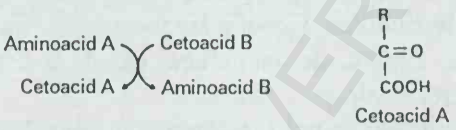


Fig. 8.2. Reacţia de transaminare.

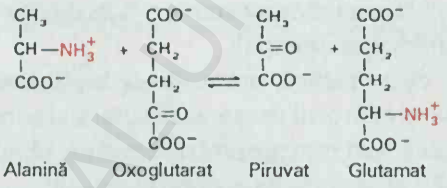
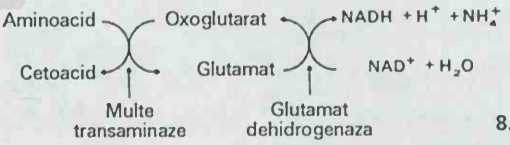


Fig. 8.3. Reacţia alanin transaminazei.



8.4. Rolul glutamat dehidrogenazei.

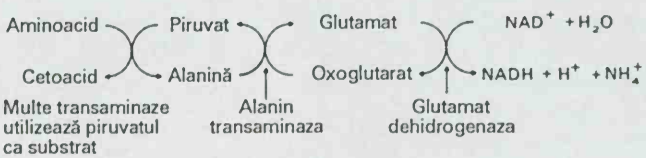


Fig. 8.5. Utilizarea piruvatului drept substrat pentru transaminaze.

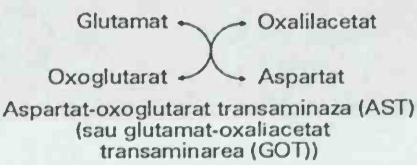


Fig. 8.6. Reacţia de transaminare aspartat – oxoglutarat.

de aminoacizi se eliberează mari cantități de dioxid de carbon, ce trebuie de asemenea înlăturat.

Carbamilfosfat sintetaza I (CPS I) are un rol major în îndepărtarea acestor doi metaboliți. Această formă a enzimei este proteina cea mai abundentă în matricea mitocondrială și leagă amoniacul liber (K_m 38 μM) de CO_2, utilizând două molecule de ATP, cu formarea carbamilfosfatului. Una din moleculele de ATP donează gruparea fosforil iar cealaltă este hidrolizată la ADP și P, cu eliberare de energie. Această enzimă necesită prezența N-acetilglutamatului (AGA), acesta fiind biosintetizat din acetilCoA și glutamat (fig. 8.9). Întrucât AGA sintetaza este activată de arginină, acest aminoacid are un efect stimulator asupra biosintezei ureei (vezi fig. 8.10). O altă formă a acestei enzime, CPS II, implicată în biosinteza pirimidinelor, diferă de prima prin faptul că utilizează glutamina ca substrat. Ea este o enzimă citosolică ce este activată de PRPP (fosforibozilpirofosfat, vezi p. 25), nu este activată de N-acetilglutamat și este inhibată de UTP.

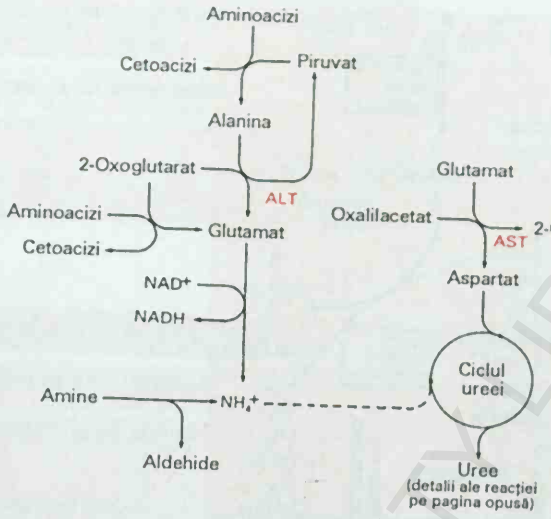


Fig. 8.7. Schema generală de transfer a grupărilor amino la uree.

BIOSINTEZA GLUTAMINEI

O reacție larg răspândită, ce transformă amoniacul într-o formă netoxică, este cea de biosinteză a glutaminei:

$$\text{Glutamat} + NH_3 + \text{ATP} \rightarrow \text{Glutamina} + \text{ADP} + P$$

Aceasta acționează în detoxifierea amoniacului în multe țesuturi și de asemenea ca vehiculant în transportul acestuia. Glutamina astfel formată poate fi utilizată în reacții de sinteză, în biosinteza purinelor și pirimidinelor sau poate fi transportată la ficat pentru a fi transformată în uree. Majoritatea cantității de uree este biosintetizată din grupările amoniu eliberate din glutamină, sub acțiunea enzimei numite glutaminază. În ficat, glutamin sintetaza este localizată în hepatocitele ce înconjoară vena centrală a lobilor hepatici, în timp ce enzimele din ciclul ureogenetic acționează în hepatocitele din regiunile periportale ale lobulilor. Influența morfologiei ficatului asupra metabolismului acestuia este discutată într-o secțiune următoare (p. 165). Din distribuția acestei enzime se pare că o altă funcție a ei ar fi cea de neutralizare a amoniului ce nu este prelucrat enzimatic prin ciclul ureogenetic. Glutamina sintetizată astfel este eliberată de ficat în sânge și poate fi hidrolizată în rinichi, cu eliberarea amoniului în urină.

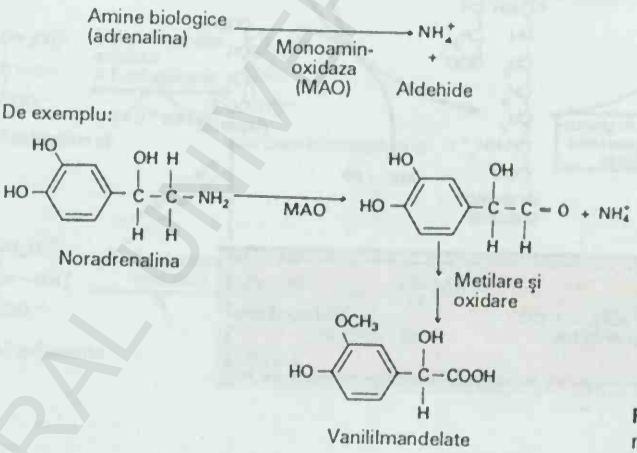


Fig. 8.8. Cataliza monoaminoxidazei.

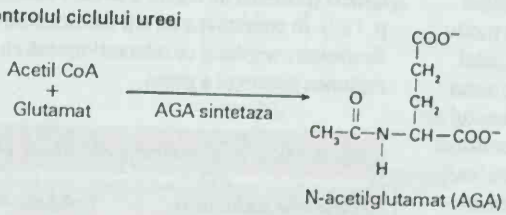


Fig. 8.9. Sinteza N-acetilglutamatului.

CICLUL UREOGENETIC

Procesele metabolice de formare a ureei sunt cunoscute sub denumirea de ciclul ureogenetic. De precizat faptul că este primul proces

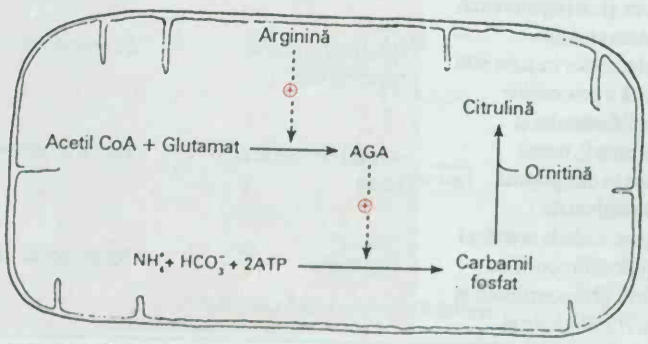


Fig. 8.10. Carbamilfosfat sintetaza activată de N-acetilglutamat.

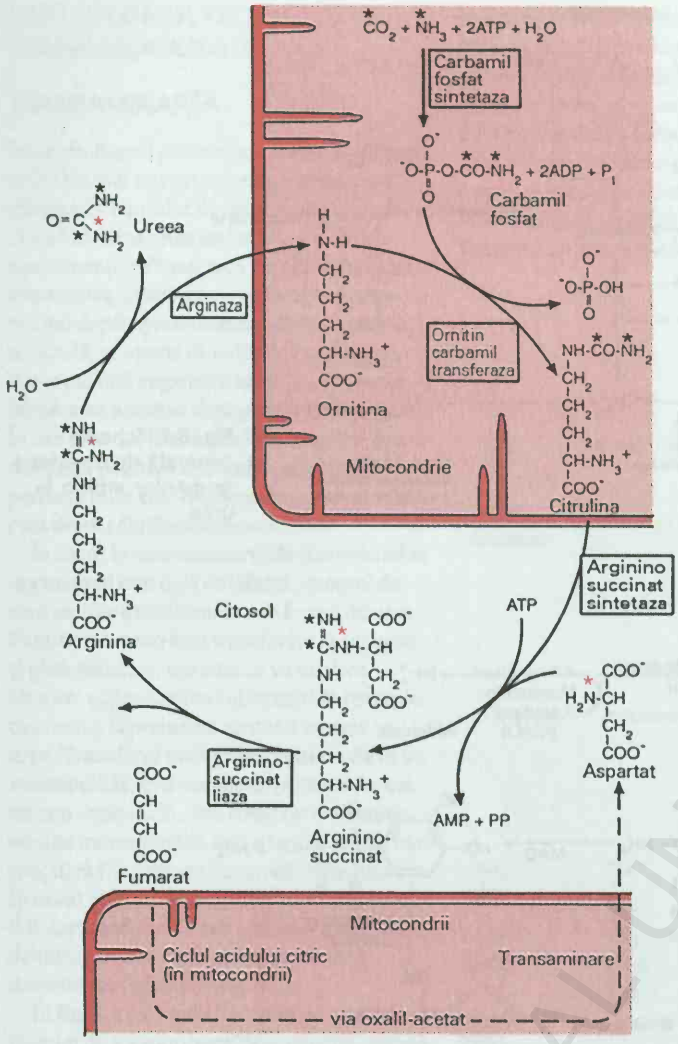


Fig. 8.11. Ciclul ureei.

ciclic descoperit de Hans Krebs (celălalt fiind ciclul acidului citric), din acest motiv fiind des întâlnit sub denumirea de ciclul Krebs al ureei. Reacțiile cuprinse în acest ciclu sunt prezentate în fig. 8.11. Punctul de plecare al acestui ciclu este reacția ornitinei cu carbamilfosfatul, cu formarea citrulinei. Aceasta reacționează apoi cu aspartatul formând argininosuccinatul, din care se eliberează apoi fumaratul, cu formarea argininei. Prin hidroliză sub acțiunea arginazei se formează uree și se regenerează ornitina necesară în reluarea ciclului. Această regenerare a moleculelor inițiale este o caracteristică importantă a proceselor ciclice. Formarea carbamilfosfatului și citrulinei are loc în mitocondrii, restul reacțiilor desfășurându-se în citoplasmă.

Ciclul ureogenetic este activat de glucocorticoizi și glucagon, ambele activând gena ce codifică CPSI, glucocorticoizi ce acționează prin receptorul glucocorticoid și glucagon acționând prin AMP-ciclic și CREB (proteina de legare a CRE, vezi p. 190). În combinație cu alți factori, aceștia formează complecși ce interacționează cu regiunea promotor a genei.

DEFECTELE EREDITARE ALE ENZIMELOR DIN CICLUL UREOGENETIC

Se cunosc mai multe boli ereditare legate de deficiența uneia sau mai multor enzime din ciclul ureogenetic, ele fiind prezentate în tabelul 8.1. Numărul de cazuri este, bineînțeles, aproximativ. Prognoza variază cu severitatea bolii. De exemplu, forma neonatală a deficienței carbamilfosfat sintetazei este asociată cu lipsa totală sau aproape totală a enzimei, și în mod normal duce la moarte în perioada neonatală. Totuși, în cazul unui deficit parțial al enzimei, se poate supraviețui până la stadiul de adult sau chiar mai mult.

REZERVA DE AMINOACIZI

AMINOACIZI ESENȚIALI ȘI NEESENȚIALI

Animalele superioare sunt capabile să sintetizeze anumiți aminoacizi necesari biosintezei de proteine. Aminoacizii ce nu pot fi sintetizați trebuie obținuți din surse alimentare și sunt cunoscuți ca aminoacizi esențiali sau indispensabili. Plantele și bacteriile sunt capabile să sintetizeze toți aminoacizii necesari biosintezei de proteine proprii, alături de mulți aminoacizi neuzuali. Aminoacizii ce pot fi biosintetizați în animale se numesc aminoacizi neesențial sau dispensabili. Tabelele 8.2 – 8.4 cuprind aceste categorii diferite de aminoacizi. Proteinele alimentare pot fi clasificate în proteine ce furnizează un echilibru bun în aminoacizi esențiali și cele ce nu furnizează acest echilibru. Din acest punct de vedere, proteinele vegetale au tendința de a fi inferioare celor animale; glutenul din grâu, de exemplu, este sărac în lizină, iar anumite proteine din orez sunt deficitare în lisină și treonină. Chiar dacă deficitul nu este același în toate proteinele vegetale, totuși amestecul acestor proteine furnizează o nutriție adecvată.

Tabelul 8.1. Anormalități ereditare ale enzimelor din ciclul ureogenetic

Enzimele deficitare	Tipul de ereditate	Trăsături caracteristice
Carbamilfosfat sintetaza	Autosomal recesivă	Hiperamonemie și aminoacidemie fără acidurie orotică
Ornitincarbamil transferaza	Dominantă, X-linkază	Hiperamonemie și aminoacidemie cu acidurie orotică
Argininosuccinat liaza	Autosomal recesivă	Acidemie argininosuccinică moderată cu acidurie argininosuccinică
Arginaza	Autosomal recesivă	Argininemia (determinată de o dietă încărcată) și argininurie

Tabelul 8.2. Aminoacizi neesenţiali biosintetizaţi direct prin transaminarea unor metaboliţi disponibili deja din procesele metabolice majore

Aminoacid	Metabolitul din care se biosintetizează
Alanina	Piruvat
Aspartat	Oxalilacetat
Glutamat	Oxoglutarat

Tabelul 8.3. Aminoacizi neesenţiali biosintetizaţi prin procese speciale

Aminoacid	Metabolitul din care se biosintetizează
Prolina	Ornitină via semialdehida glutamică
Glicina	Serina
Serina	3 – Fosfoglicerat
Cisteina	S – Adenozilmetionină şi serină
Tirozina	Fenilalanină
Arginina	Ornitină *

* Arginina este necesară în dietă pentru o creştere normală la copii / tineri

Tabelul 8.4. Aminoacizi esenţiali la om

- Histidina
- Izoleucina
- Leucina
- Lizina
- Metionina
- Fenilalanina
- Treonina
- Triptofan
- Valina

BIOSINTEZA AMINOACIZILOR NEESENŢIALI

Aminoacizii neesenţiali pot fi biosintetizaţi din precursori glucidici, cu condiţia ca o sursă de azot aminic să fie disponibilă. Piruvatul, oxolilacetatul şi oxiglutaratul sunt toţi intermediari în metabolismul glucidelor (vezi, de exemplu, ciclul acidului citric, p. 124). Fiind cetoacizii corespunzători alaninei, aspartatului respectiv glutamatului, ei se pot forma prin reacţii de transaminare. Serina este biosintetizată din acid 3-fosfogliceric, un intermediar în procesul de glicoliză (p. 122). Procesul de biosinteză al serinei este prezentat în fig. 8.12. Glicina şi serina sunt interconvertibile prin reacţia redată în fig. 8.13, necesară de asemenea biosintezei *de novo* a glicinei.

S-Adenozilmetionina (AdoMet), ce acţionează ca donor de grupări metil în numeroase reacţii – vezi, de exemplu, biosinteza adrenalinei (p. 113) – se formează din metionină şi ATP (fig. 8.14). O reacţie generală de transfer a grupării metil este prezentată în fig. 8.15. Prima etapă în procesul de formare al cisteinei implică transformarea S-adenozilmetioninei în S-adenozilhomocisteină, prin transferul unei grupări metil unui acceptor, cum este acidul guanidinoacetic, cu formarea creatinei. S-adenozilhomocisteina (AdoHcy) este apoi scindată în adenozină şi homocisteină. Homocisteina reacţionează apoi cu serina, ce suplineşte atomii de carbon şi gruparea amino a cisteinei, formând cistationina, ce este apoi scindată la homoserină şi cisteină.

S-adenozilmetionina participă la o serie de alte reacţii, aşa cum se observă în fig. 8.16. Astfel, după decarboxilare, poate elibera propilamina ($CH_3\ CH_2\ CH_2\ NH_3^+$)

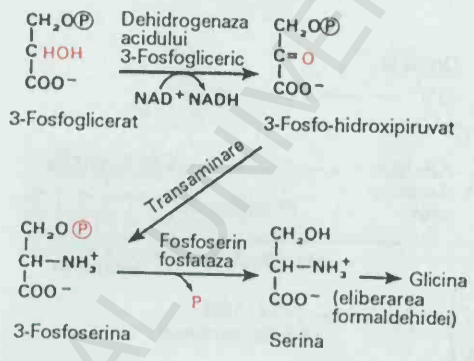


Fig. 8.12. Sinteza serinei din 3-fosfo-glicerat.

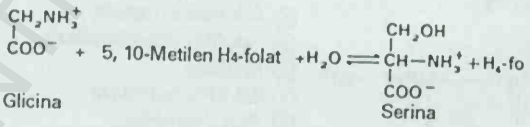
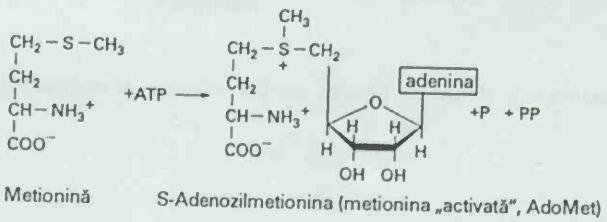


Fig. 8.13. Interconversia glicinei şi serinei.



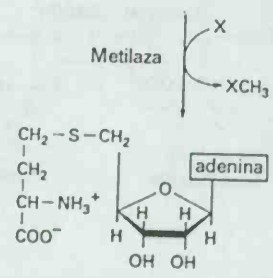


Fig. 8.14. Formarea S-adenozil- metioninei din metionină şi ATP.

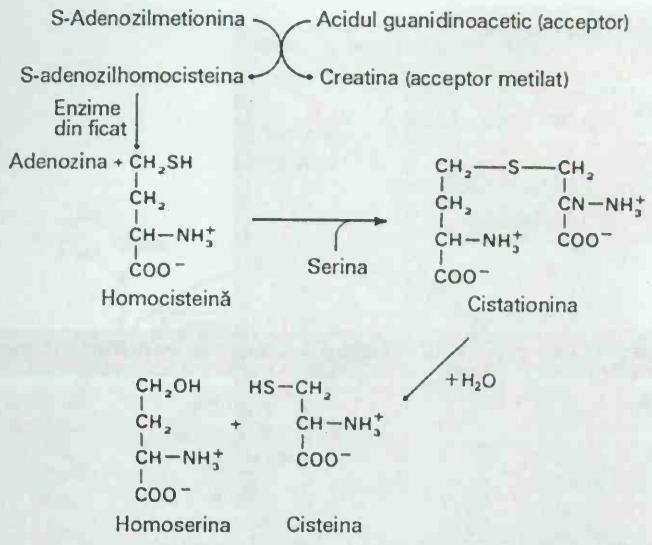


Fig. 8.15. Sinteza cisteinei din serină și grupări sulfhidril provenind de la metionină.

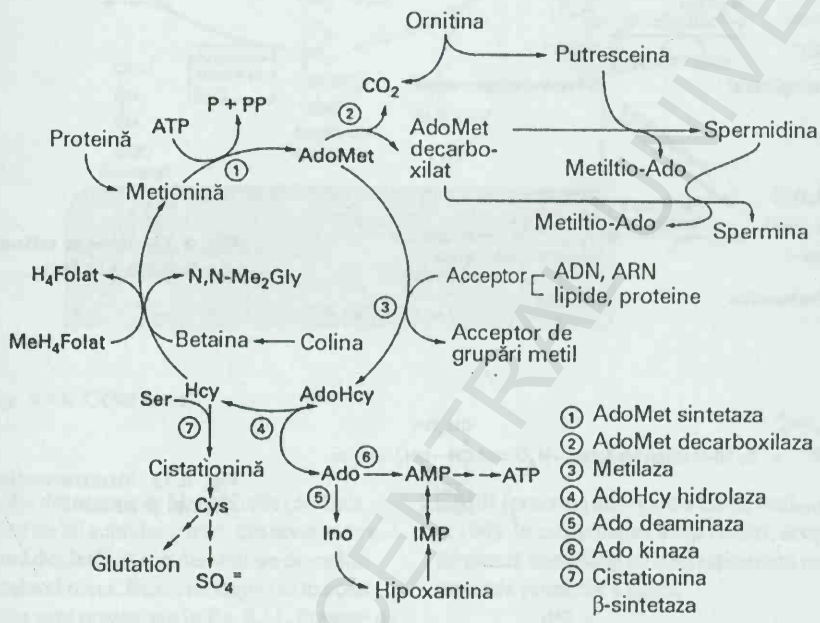


Fig. 8.16. S-adenozilmetionina este donor de grupări metil în diverse căi metabolice.

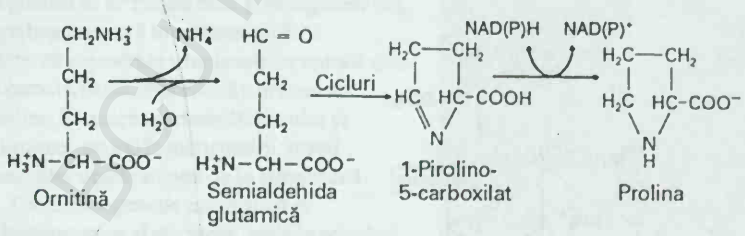


Fig. 8.17. Sinteza prolinei din ornitină.

ce este implicată în biosinteza sperminei și spermidinei, poliamine importante în metabolismul acizilor nucleici. importante în metabolismul acizilor nucleici. Betaina și metiltetrahidrofolatul funcționează ca donori alternativi de metil în conversia homocisteinei la metionină. Cu toate acestea, în deficitul de folat, homocisteina tinde să se acumuleze. Acest fapt a fost sugerat ca un factor de risc în bolile de inimă. Nivelul homocisteinei în sânge poate fi utilizat ca un indicator al nivelului folatului.

Prolina se formează din ornitină, după îndepărtaea grupării amino prin transaminare, cu formarea semialdehidei glutamice, care prin ciclizare formază 1-prolin-5-carboxilatul (vezi fig. 8.17). Acesta este apoi redus de NADH la prolină.

Tirozina se formează din fenilalanină, prin acțiunea fenilalaninhidroxilazei, această reacție fiind discutată în secțiunea următoare.

CATABOLISMUL AMINOACIZILOR ESENȚIALI ȘI FORMAREA ADRENALINEI, HISTAMINEI, TIROXINEI ȘI A SEROTONINEI

CATABOLISMUL FENILALANINEI ȘI TIROZINEI

Fenilalanina poate fi transaminată la acid fenilpiruvic, care în mod normal este un proces minor, dar este implicat în boala ereditară numită fenilcetonurie. În mod normal fenilalanina este degradată prin conversie la tirozină. Prima etapă în degradarea tirozieni este transaminarea ei la 4-hidroxifenil-piruvat (fig. 8.18). Acesta suferă o decarboxilare oxidativă, catalizată de 4-hidroxifenilpiruvat dioxigenaza, în care se introduce o nouă grupare hidroxil în nucleul benzenic, rezultând homogentizat. Această reacție este una complexă ea implicând participarea ascorbatului drept coenzimă. Oxidarea ulterioară, sub acțiunea homogentizat dioxigenazei, duce la deschiderea ciclului, care în continuare, așa cum reiese din fig. 8.18, este degradat la fumarat și acetoacetat. In această cale catabolică merită menționat că deficiența unor enzime conduce la apariția unor boli ce se numără printre primele boli menționate ca având origine genetică descrise de Arcghibald Garrod, la începutul secolului XX. Printre acestea se numără alcaptonuria, ce apare datorită unui deficit de homogentisat dioxigenază, în care homogentizatul se acumulează și se elimină în urină ce astfel prin păstrare devine neagră. Albinismul se manifestă prin pierderea pigmentației (de exemplu cea a pielii și a părului) și apare datorită deficitului în enzime implicate în transformarea tirozinei în melanină. O altă

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITARĂ

boală genetică asociată cu acest proces este tirozinoza. Ea este datorată deficienței în 4-hidroxifenilpiruvat dioxigenază, astfel că 4-hidroxifenilpiruvatul și tirozina se acumulează în urină.

Fenilalanil hidroxilaza este una din enzimele familiei hidroxilazelor specifice aminoacizilor aromatici, ce introduce o grupare hidroxil în ciclul aromatic, alte enzime înrudite fiind tirozin hidroxilaza și triptofan hidroxilaza. Aceste enzime prezintă aceleași caracteristici fizice, structurale și catalitice. Sunt monoxigenaze ce utilizează oxigen molecular și pteridin coenzima, ce reduce un atom de oxigen la H_2O prin intermediul 4-α-carbinolaminei, celălalt atom de oxigen fumizând gruparea hidroxil. În cazul hidroxilazelor aminoacizilor aromatici, coenzima este tetrahidrobiopterina, ce în timpul reacției este oxidată la dihidrobiopterina, sub acțiunea dihidrobiopterin reductazei, ce utilizează NADH drept coenzimă (vezi fig. 8.19).

Fenilcetonuria rezultă în urma mutațiilor genei fenilalanil hidroxilazei. Ineficiența acestor enzime are drept consecință imposibilitatea catabolizării fenilalaninei, care astfel se acumulează în ficat, ceea ce are drept rezultat procese metabolice minore cum ar fi transaminarea fenilalaninei la fenilpiruvat. Dacă aceste deficiențe nu sunt tratate pot apărea afecțiuni severe, cum este retardarea mintală. Fenilcetonuria poate fi diagnosticată prin identificarea fenilpiruvatului în urina copiilor. O metodă mai bună este utilizarea testului microbiologic, ce identifică în fază timpurie nivele crescute de fenilalanină, acest test fiind cunoscut sub numele de testul Guthrie. Aceste afecțiuni pot fi tratate cu succes prin administrarea unei diete cu conținut scăzut în fenilalanină, utilizând proteine hidrolizate modificate. Fenilcetonuria este prima boală genetică pentru care s-a descoperit o terapie eficientă. Variante ale acestei boli rezultă prin apariția unor tulburări în biosinteza tetrahidrobiopterinei sau reducerea dihidrobiopterinei. În aceste cazuri, prin administrare de 5-hidroxitriptofan, precursor al serotoninei, și DOPA (3,4-dihidroxifenilalanină), precursor al catecolaminelor, se previne apariția unor deficiențe grave a neurotransmițătorilor.

Gena ce codifică fenilalanil hidroxilaza se exprimă doar în ficat și este produsul unui singur locus. Sunt cunoscute aproximativ 200 de mutații Gena are o lungime de 65Kb, cu mai mulți introni; aproximativ 10% din mutații având loc în introni și afectând îmbinarea corectă. (vezi Cap. 3). Diagnosticarea prenatală în familii cu antecedente în această boală se poate realiza prin tehnici moleculare genetice. Fig. 8.20 pre-

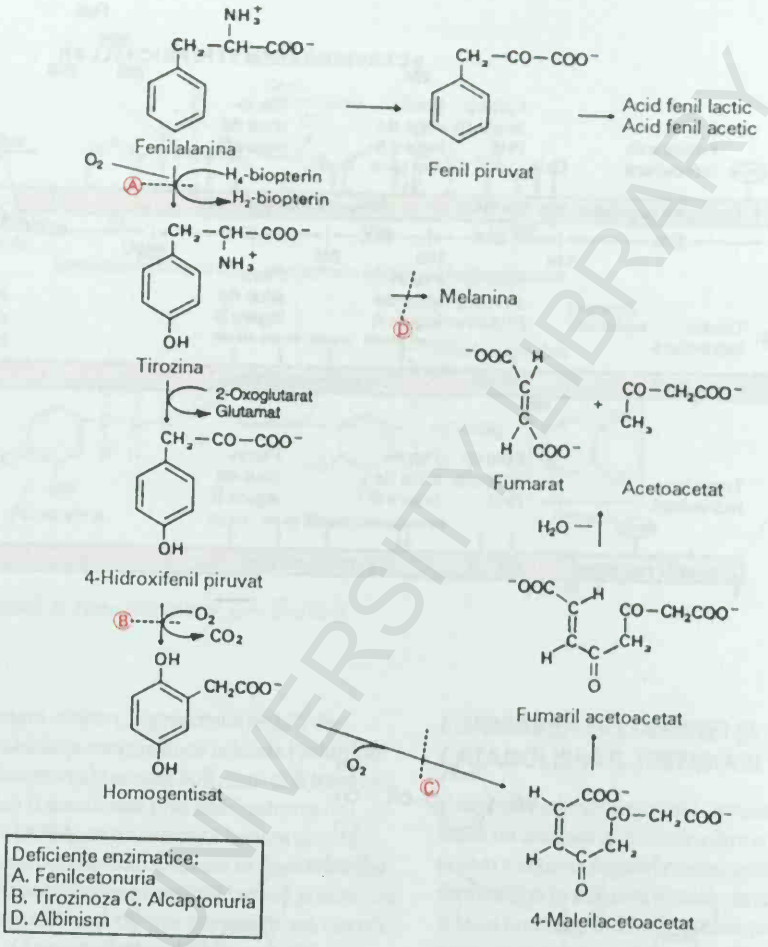


Fig. 8.18. Catabolismul fenilalaninei și tirozinei.

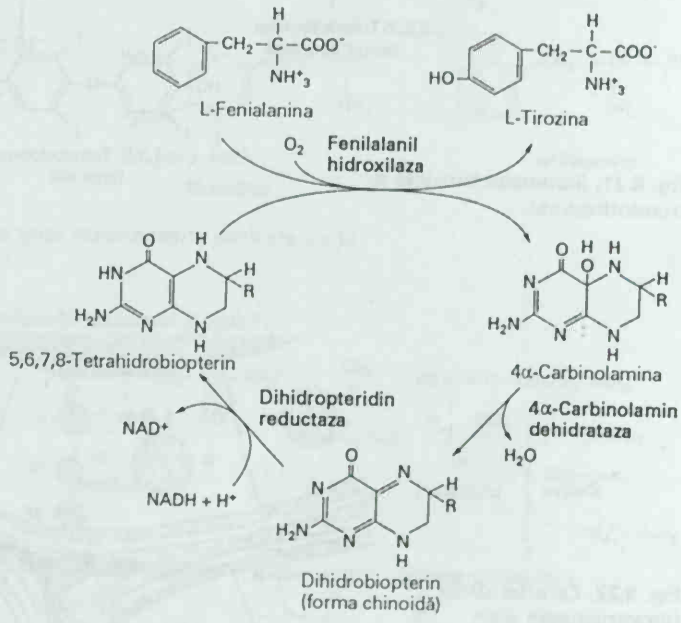


Fig. 8.19. Reacția fenilalanin hidroxilazei.

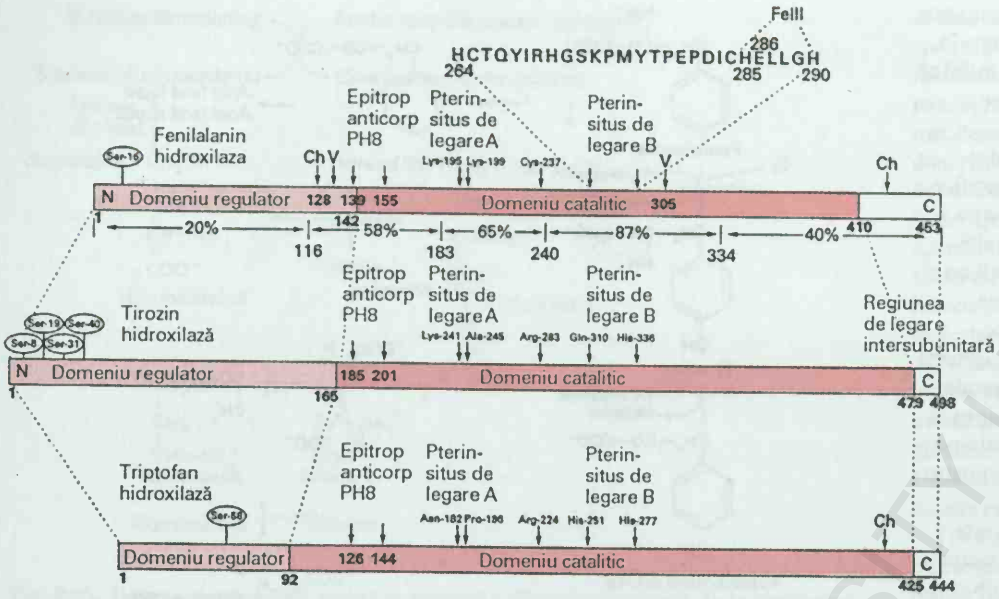


Fig. 8.20. Hidroxilazele aminoacizilor aromatici.

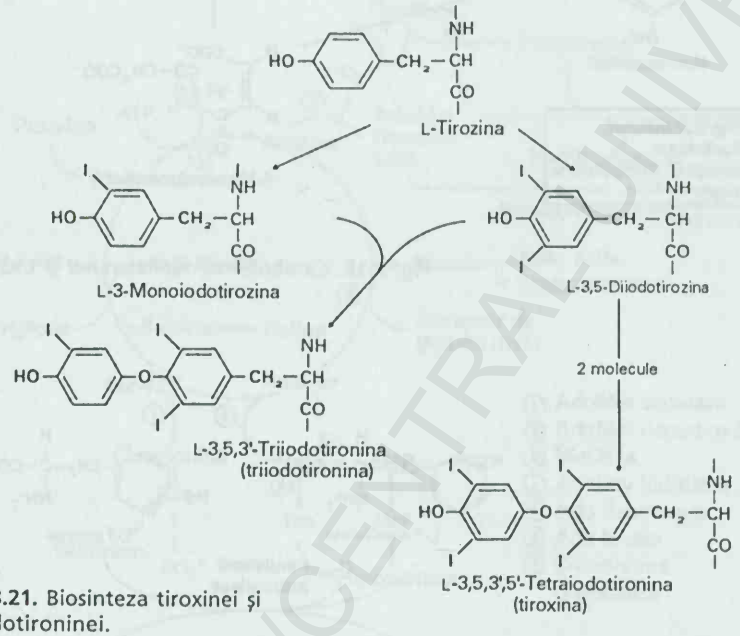


Fig. 8.21. Biosinteza tiroxinei şi triiodotroninei.

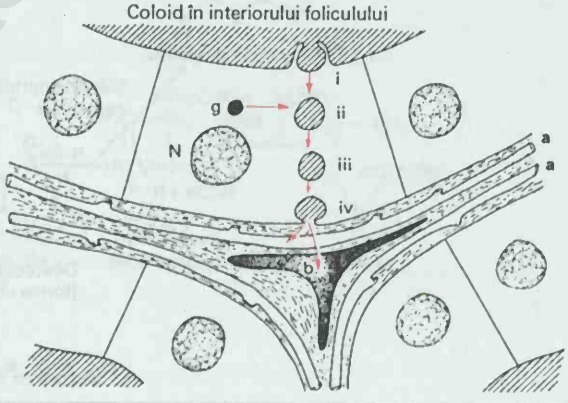


Fig. 8.22. Caracteristicile ultrastructurale ale biosintezei tiroxinei. N, nucleul celular. Pentru detalii vezi textul.

zintă relaţia structură – funcţie pentru trei hidroxilaze ale aminoacizilor aromatici şi indică faptul că genele au probabil o origine evolutivă comună.

FORMAREA HORMONILOR TIROIDIENI

Biosinteza hormonilor tiroxină (T4) şi triiodotironină (T3) implică iodurarea resturilor de tirozină din tireoglobulină, proteina prezentă în foliculii din interiorul glandei tiroide, aceste reacţii fiind prezentate în fig. 8.21. În interiorul foliculilor, coloidul conţinând tireoglobulină este preluat în vezicule, unde este degradat. Aşa cum este prezentat schematic în fig. 8.22, veziculele ce conţin coloidul sunt preluate din coloidul principal de rezervă, printr-un proces de fagocitoză (etapa (i) din fig. 8.22). Etapa (ii) implică transferul enzimelor hidrolitice din granulele dense (g) şi este urmată de etapa (iii), etapa de digestie a coloidului, proces ce poate fi urmărit histochimic, utilizând reacţia acid periodic – Schiff, specifică glucidelor. O scădere a coloraţiei indică scindarea glicoproteinelor din coloid. În etapa (iv) eliberarea iodotironinelor are loc în capilara sanguină a tiroidei (a) sau în cea limfatică (b). T4 este componentul major secretat şi este prezent în sânge în concentraţii de 20-50 de ori mai mari decât T3. Cu toate acestea, T4 este convertit în ţesuturi la T3, acesta fiind cel care se leagă de receptori în nucleu, determinând creşterea concentraţiei de ARNm şi biosinteza de proteine.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

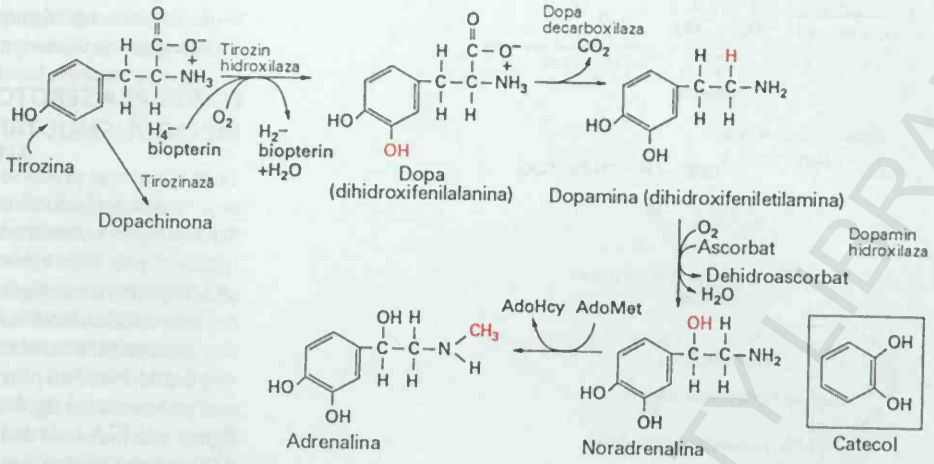


Fig. 8.23. Biosinteza adrenalinei şi noradrenalinei din tirozină.

FORMAREA ADRENALINEI ŞI NORADRENALINEI

Adrenalina şi noradrenalina sunt hormoni medulosuprarenali. Ambii funcţionează ca neurotransmiţători – adrenalina pentru anumiţi neuroni stem şi noradrenalina în sistemul nervos simpatic. Ei se formează prin procesul biosintetic prezentat în fig. 8.23 şi sunt cunoscuţi şi sub denumirea de catecolamine deoarece sunt catecoli (o-dioli aromatici) ce conţin şi grupări amino. Această denumire se atribuie de asemenea, oricărui derivat al acestor hormoni ce prezintă aceste caracteristici structurale.

Procesul de biosinteză din tirozină începe prin introducerea unei a doua grupări hidroxil în nucelul tirozinei, de către tirozin-3-monoxigenază (tirozin hidroxilază), o enzimă ce catalizează reacţia similară cu cea a fenilalanil hidroxilazei (p. 111). În continuare, prin decarboxilare se formează dopamina. Noradrenalina se formează din dopamină, printr-o altă hidroxilare, de această dată fiind introdusă o grupare hidroxil alifatică, în poziţia β- a catenei dopaminei. Această reacţie este catalizată de dopamin β-monoxigenază, ce utilizează ascorbatul drept coenzimă donoare de atomi de hidrogen. În continuare, prin metilare, utilizând S-adenozilmetionina, se formează adrenalina.

Dopamina este şi ea implicată în neurotransmisie. Ea este importantă mai ales în substanţa cenuşie, o parte a creierului denumită astfel datorită conţinutului ridicat în pigment negru, melanina, pentru care dopachinona este un precursor, format din tirozină sub acţiunea tirozinazei. Substanţa cenuşie este importantă în medierea activităţii motoare a creierului. Distrugerea celulelor negro-striate („nigrostriatal cells") din substanţa cenuşie duce la boala Parkinson. Simptomele acestei boli, cum ar fi tremurul, pot fi ameliorate prin administrarea de L-DOPA, ce traversează bariera sânge – creier şi este transformată în dopamină (ce nu poate traversa această barieră şi astfel nu este eficientă când se administrează direct).

O structură apropiată dopaminei este cea a mescalinei, un drog halucinogen extras din butonii mescali a unui cactus fără spini („spineless pezote cactus") şi amfetamina, un drog sintetic ce dă o senzaţie de alertă şi o stare de bună dispoziţie (vezi fig. 8.24).

FORMAREA HISTAMINEI ŞI CATABOLISMUL HISTIDINEI

Histamina este un important „autacoid", adică un compus secretat de către o celulă pentru a acţiona împotriva altei celule şi se formează prin acţiunea histidin decarboxilazei (vezi fig. 8. 25). În continuare, prin acţiunea monoaminoxidazei, se formează imidazolil aldehida, ce este oxidată la imidazolil acetat, formă sub care se elimină în urină. O altă cale de degradare a histidinei este prezentată în fig. 8.26.

Formiminoglutamatul (FIGLU) este necesar

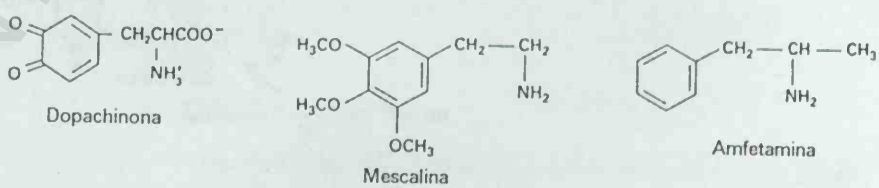


Fig. 8.24. Structura unor medicamente derivate de la catecolamine.

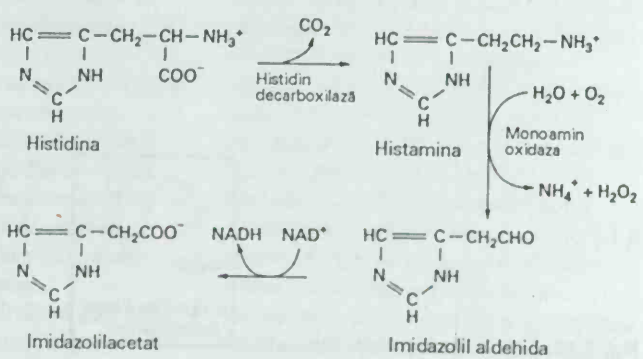


Fig. 8.25. Biosinteza şi catabolismul histaminei.

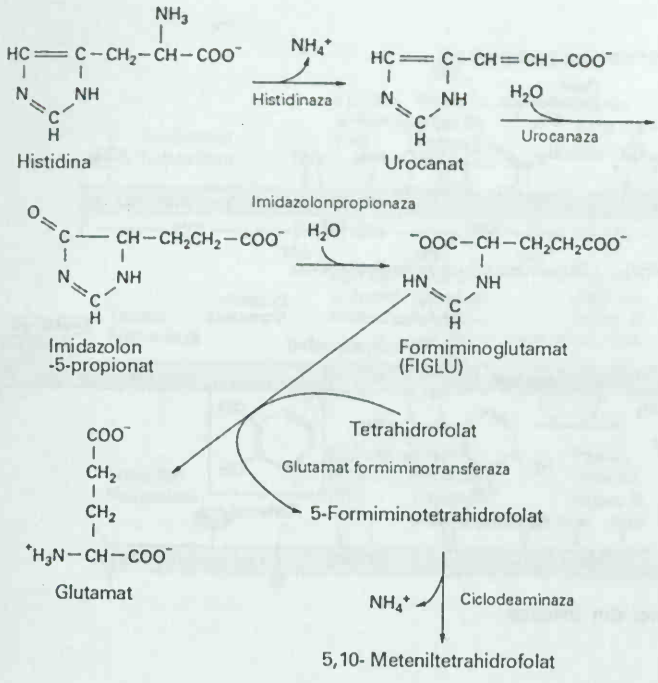


Fig. 8.26. Metabolismul histidinei.

pentru formarea unei folat coenzime, formiminotetrahidrofolat (vezi p. 96).
FIGLU se acumulează și se elimină în urină în cazul ineficienței formiminotransferazei și în deficit de folat sau vitamină B_{12}.

FORMAREA SEROTONINEI ȘI METABOLISMUL TRIPTOFANULUI

Triptofanul este precursor pentru doi compuși importanți, serotonina și nicotinamida. Serotonina (5-hidroxitriptamina) se formează prin hidroxilarea triptofanului, de către triptofan monoxigenază, urmată apoi de etapa de decarboxilare. Serotonina este un neurotransmițător cu efecte variate și larg răspândite. Procesul prin care este degradată este reprezentat în fig. 8.27. În această figură, este prezentat de asemenea procesul de biosinteză a nicotinamidadenin

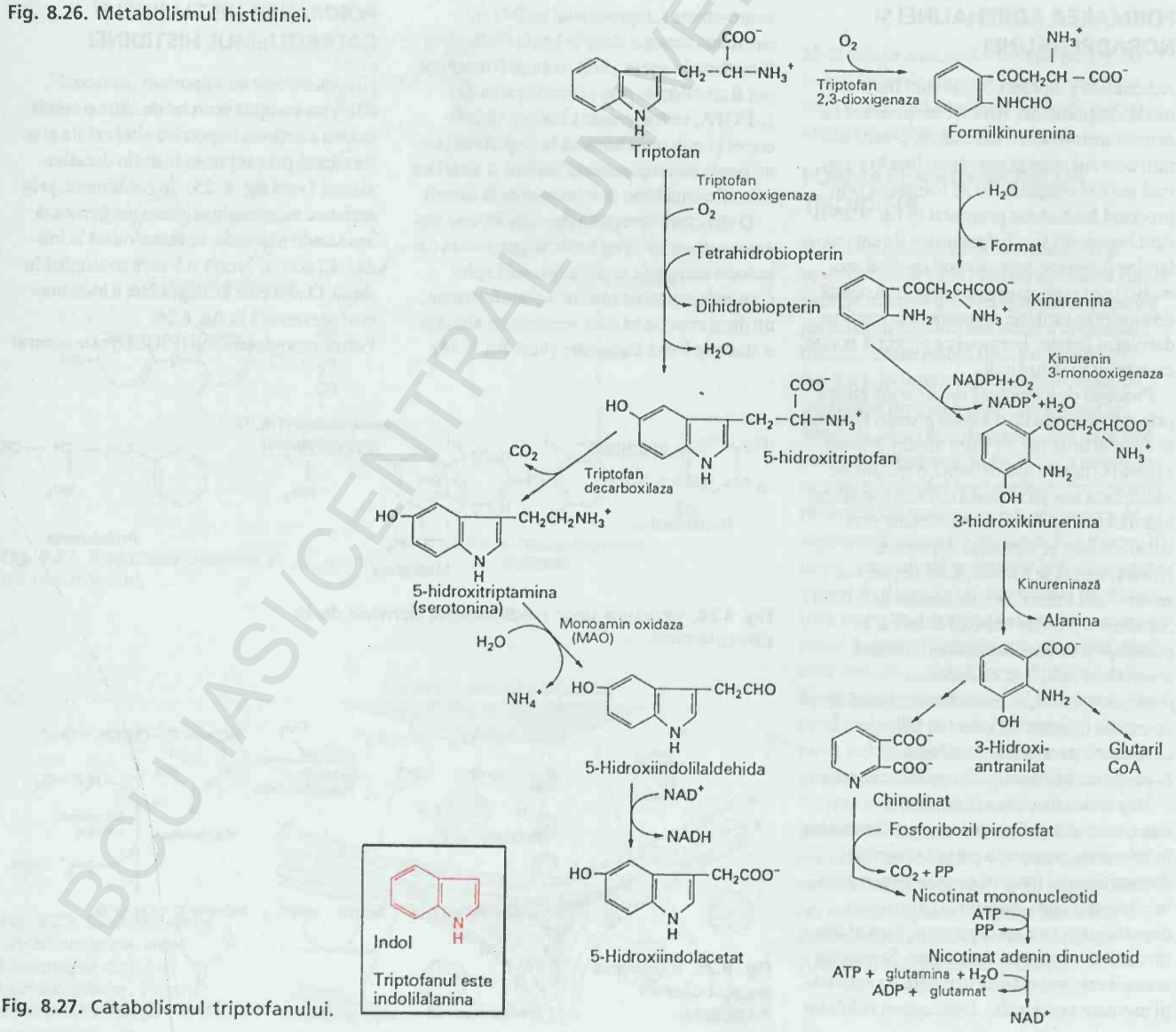


Fig. 8.27. Catabolismul triptofanului.

dinucleotidului (NAD) din triptofan, proces specific animalelor (inclusiv oamenilor). Totuşi, dacă nivelul de triptofan din dietă este scăzut, acest proces nu este suficient de activ pentru a forma cantităţile necesare de nicotinamidă, deficitul acesteia ducând adesea la pelagră.

FOSFOCREATINA

Aşa cum se arată în fig. 8.28, anumite reacţii din cadrul metabolismului azotului, ce sunt importante în muşchi, implică participarea creatinei, un compus guanidinic derivat din arginină. Gruparea guanidinică poate fi fosforilată sub acţiunea creatin kinazei, utilizând ATP ca agent de fosforilare, cu formarea fosfocreatinei. Acest produs poate reacţiona cu ADP formând ATP şi creatină. În timpul contracţiei musculare, prin scăderea bruscă a nivelului de ATP, se asigură formarea acestuia prin acţiunea creatin kinazei. Aceasta asigură ATP necesar contracţiei, înaintea activării glicolizei.
Fosfocreatina şi creatina pot fi metabolizate la creatinină. Această metabolizare este destul de constantă de-a lungul a 24 de ore, creatinina în urină fiind uneori utilizată ca substanţă de referinţă în determinarea metaboliţilor eliminaţi în urină.

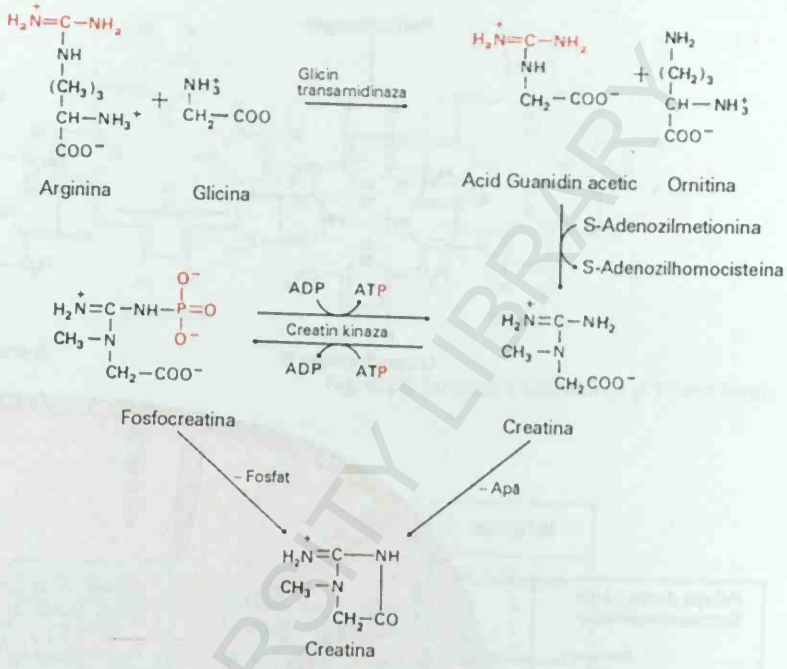


Fig. 8.28. Biosinteza creatinei şi creatininei din arginină şi glicină.

ACIDUL γ– AMINOBUTIRIC

Acidul γ-aminobutiric, $NH_2CH_2CH_2CH_2COOH$, cunoscut sub abrevierea GABA, se formează sub acţiunea glutamat decarboxilazei, ce îndepărtează gruparea α - carboxil din glutamat. Acesta acţionează ca un inhibitor al neurotransmiţătorilor din creier, la fel ca şi glicina. Alţi aminoacizi sau derivaţi ai acestora, ce prezintă funcţii neurotransmiţătoare, sunt glutamatul, adrenalina, noradrenalina, histamina şi serotonina (5-hidroxitriptamina), formarea lor fiind descrisă anterior. Acţiunea lor în creier este independentă de concentraţia din sânge, unde câţiva dintre ei circulă ca hormoni. Funcţia neurotransmiţătoare a GABA este implicată în apariţia anumitor efecte ale deficitului în vitamină B_6 (p. 96).

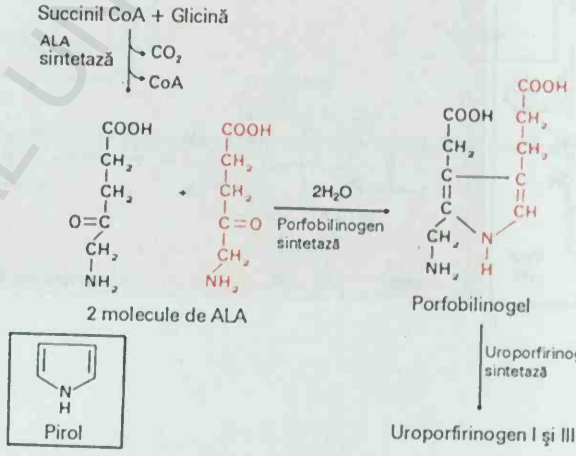


Fig. 8.29. Biosinteza porfobilinogenului din succinilCoA şi glicină.

BIOSINTEZA ŞI METABOLISMUL HEMULUI

BIOSINTEZA HEMULUI

Hemul prezintă o importanţă deosebită, fiind component al citocromilor şi hemoglobinei. Biosinteza lui începe cu formarea 5-aminolevulinatului (ALA), pornind de la o moleculă de succinilCoA şi una de glicină, sub acţiunea aminolevulinat sintetazei. Apoi, două molecule de 5-aminolevulinat sunt condensate rezultând porfobilinogenul. Patru molecule de porfobilinogen sunt apoi condenstae, în două etape, formând uroporfirinogenul III (fig. 8.29). Se formează de asemenea uroporfirinogenul I, dar acesta nu este parte a procesului de biosinteză a hemului.
Biosinteza 5-aminolevulinatului are loc în mitocondrii, în timp ce porfobilinogenul se formează în citosol. Denumirea de tetrapirol se referă la un grup mare de compuşi, ce conţin patru cicluri pirolice şi se găsesc peste tot în plante şi animale.
Uroporfirinogenul I şi III diferă doar prin faptul că ordinea carboximetilului şi carboxietilului este inversată în unul dintre ciclurile pirolice. Doar uroporfirinogenul III este utilizat în biosinteza hemului. Aceasta continuă cu formarea în citosoli a coproporfirinogenului III. Acesta este apoi succesiv transformat, în mitocondrii, în protoporfirinogen IX, protoporfirina IX şi hem, aşa cum reiese din fig. 8.30. După formarea uroporfirinogenului III au loc modificările resturilor carboximetil (acetic) şi carboxietil (propionic) la metil respectiv vinil şi rearanjarea legăturilor duble. Introducerea atomului de fier are loc în etapa finală, prin acţiunea enzimei ferochelatază.

© IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

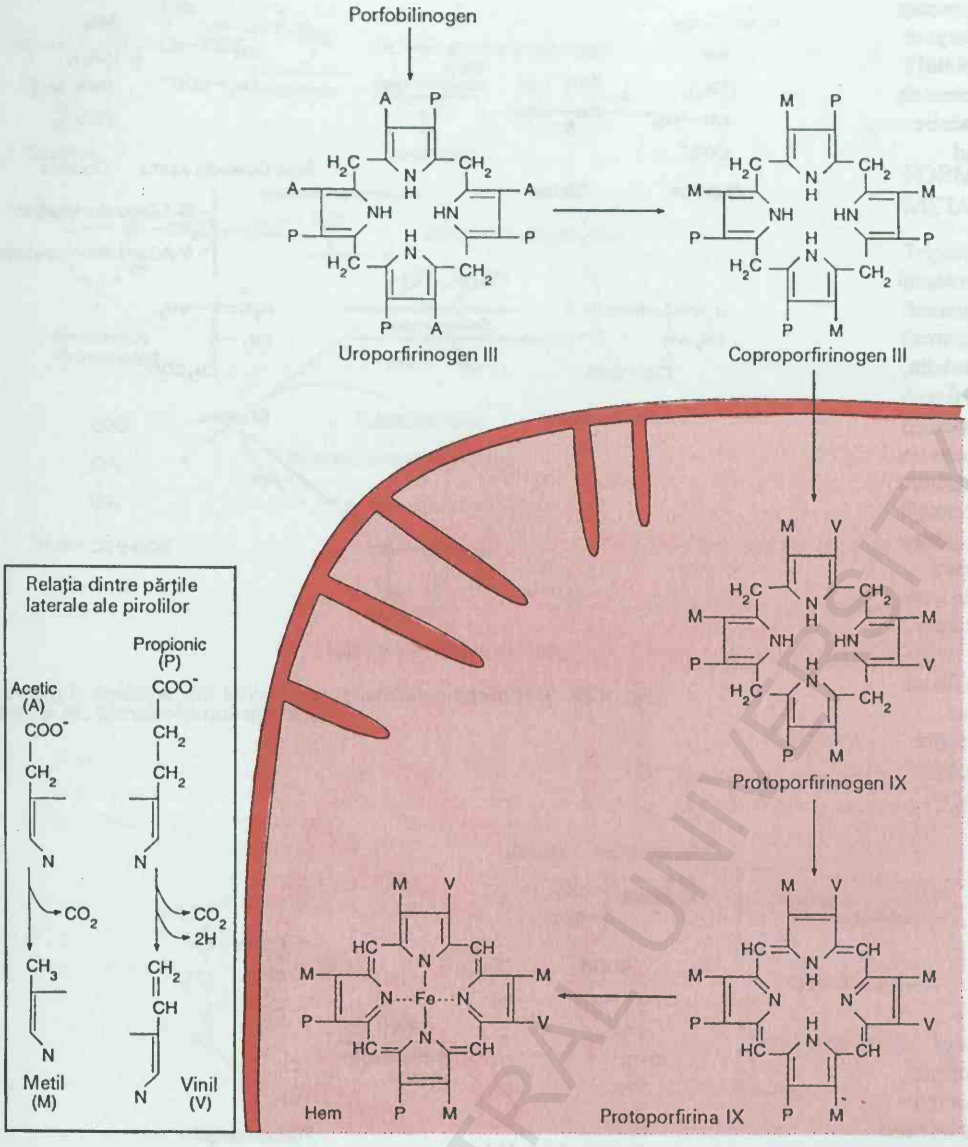


Fig. 8.30. Biosinteza hemului.

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 8.5. Porfiriile

Denumire	Celule afectate	Tipul de ereditate	Compuși acumulați	Diagnostic
Uroporfiria eritropoetică	Eritrocite	Autosomal recesivă	Uroporfirina I Coproporfirina	1. Amândoi compușii apar în urină, fecale și în celulele roșii 2. Fluorescența celulelor roșii în lumină ultravioletă
Protoporfiria eritropoetică	Eritrocite	Autosomal dominantă	Protoporfirina	Excreția protoporfirinelor în fecale
Porfiria acută intermitentă	Ficat (hepatocite)	Autosomal dominantă	Aminolevulinat Porfobilinogen	1. Amândoi compușii apar în urină 2. La lumină, urina trece în roșu intens, porfobilinogenul fiind transformat în uroporfirină

PORFIRIILE

Se cunosc numeroase boli genetice datorate dereglărilor în metabolismul porfirinelor, numite porfirii, câteva dintre acestea regăsindu-se în tabelul 8.5. Porfiriile acute prezintă simptome neurologice şi dureri abdominale. Porfobilinogenul se acumulează în urină şi este utilizat în diagnosticare. S-a sugerat faptul că una dintre porfiriile intermitente ar fi putut fi cauza nebuniei regelui britanic George III-lea.

PIGMENŢII BILIARI

Odată cu degradarea celulelor roşii de către macrofagele sistemului fagocitar mononuclear, hemul este degradat la biliverdină. Acest proces presupune oxidarea punţilor interpirolice. Prin reducerea biliverdinei se formează bilirubina (fig. 8.31). Bilirubina se formează de asemenea din hem-proteinele din ţesuturile periferice. Bilirubina este transportată de albumine la ficat unde se conjugă cu acidul glucuronic cu formare de glucuronide prin reacţie cu acid UDP - glucuronic. O bis-diglucuronidă poate rezulta prin conjugare la nivelul celor două resturi de acid propionic. Bilirubinglucuronidele sunt antrenate în secreţia biliară şi apoi în intestin unde sunt metabolizate în continuare. O parte se resorb în intestin şi apoi se reîntorc în bilă. Un mic procent poate fi eliminat din sânge prin rinichi iar apoi eliminat în urină (fig. 8. 32).

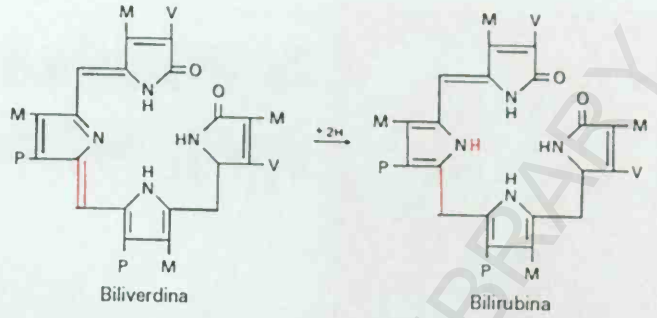


Fig. 8.31. Structura bilirubinei şi biliverdinei.

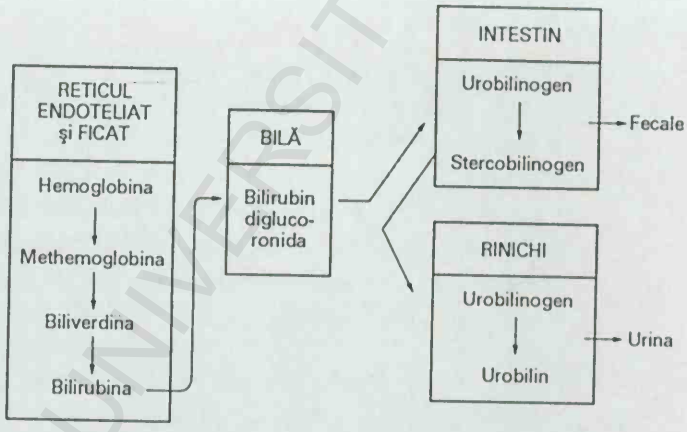


Fig. 8.32. Metabolismul şi excreţia biliverdinei şi bilirubinei.

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Catabolismul oxidativ al glucozei și al acizilor grași

9

În acest capitol sunt prezentate principalele reacții metabolice împreună cu mecanismele prin care celulele realizează reacții care, din punct de vedere energetic sunt nefavorizate. O succesiune de reacții chimice urmează aceleași reguli ca o reacție independentă și decurge în sensul în care energia liberă are valori negative. Deoarece moleculele complexe au în general o energie molară liberă ridicată, biosinteza lor trebuie să decurgă printr-o serie de reacții parțiale, legate de alte procese în care se eliberează energie, în așa numitele reacții cuplate. Aceste procese implică frecvent reacții în care substratul este ATP deoarece reacțiile de hidroliză a legăturilor de tip anhidridă dintre grupările sale fosfat decurg cu o variație negativă mare a energiei libere. Regenerarea continuă a ATP necesar proceselor biosintetice se realizează prin cuplarea formării ATP cu oxidarea glucozei (glicoliză) sau a acizilor grași (β-oxidare), amândouă aceste procese fiind exergonice. Produșii glicolizei și ai β-oxidării sunt în continuare oxidați la CO_2 și H_2O prin lanțul transportor de electroni al citocromilor ce conțin hem și cu formarea ulterioară a ATP (fosforilare oxidativă).

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

β-OXIDAREA ŞI GLICOLIZA

Forţele care induc procesele metabolice

S-a explicat anterior (p. 81) că reacţiile chimice decurg în direcţia în care variaţia energiei libere este negativă. Secvenţele de reacţii care alcătuiesc căile metabolice sunt guvernate de către aceleaşi legi termodinamice ca şi reacţiile individuale. Adică reacţiile decurg în aşa fel încât produşii de reacţie, în orice moment al reacţiei, să aibă energia liberă mai mică decât a reactanţilor. În general, degradarea moleculelor mari la molecule mai mici este un proces asociat cu o scădere a energiei libere, de aceea procesele de oxidare sunt exoterme. Sinteza moleculelor mari din molecule mici este un proces ce duce la creşterea energiei libere a moleculelor sintetizate, deci reacţiile ce alcătuiesc căile biosintetice includ reacţii parţiale cu energie liberă negativă care orientează procesul în direcţia sintezei. Trebuie reamintit că variaţia totală a energiei libere a unei reacţii este suma variaţiilor energiilor libere ale reacţiilor parţiale din care acesta este alcătuit. Astfel, aşa cum se explică la p. 82, includerea reacţiei parţiale ATP → ADP + P, cu o energie liberă negativă mare, poate fi legată cu o reacţie parţială de biosinteză cu energie liberă pozitivă dar mică, în aşa fel încât reacţia decurge în sensul biosintezei.

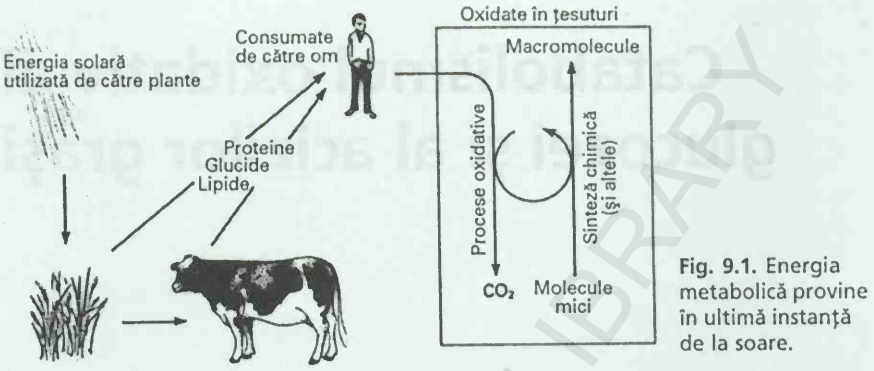


Fig. 9.1. Energia metabolică provine în ultimă instanţă de la soare.

În cele din urmă, viaţa depinde de utilizarea energiei emisă de către soare. Procesul de fotosinteză utilizează fotonii pentru a determina formarea glucidelor din dioxid de carbon şi apă iar viaţa animalelor depinde de substanţele nutritive produse prin acest proces (fig. 9.1). Strategia folosită de către organismele vii pentru a-şi procura energia necesară existenţei este aceea de a obţine substanţe nutritive care pot fi supuse oxidării, şi în acest fel să furnizeze componenţi ca ATP. Aceştia pot fi încorporaţi în căile biosintetice şi pot asigura acestor căi o variaţie totală negativă a energiei libere, deoarece concentraţia reactanţilor contribuie la variaţia energiei libere a reacţiei. De aceea, dacă concentraţia NADPH este mult mai mare decât cea a $NADP^+$, atunci într-un

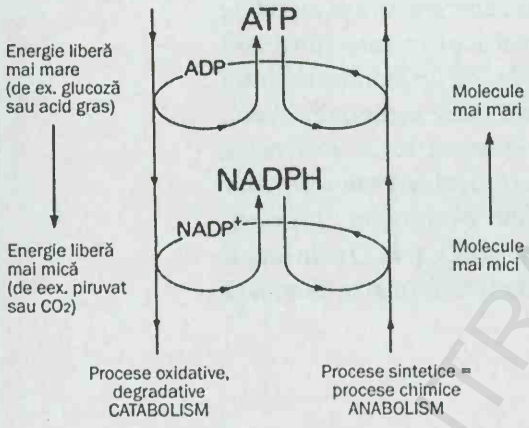


Fig. 9.2. Nicotinamida şi adenin nucleotidele leagă procesele catabolice şi cele anabolice.

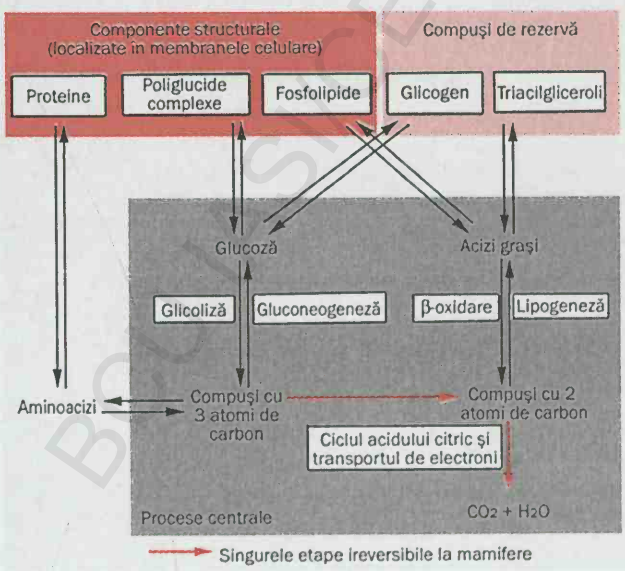


Fig. 9.3. Schema căilor metabolice majore.

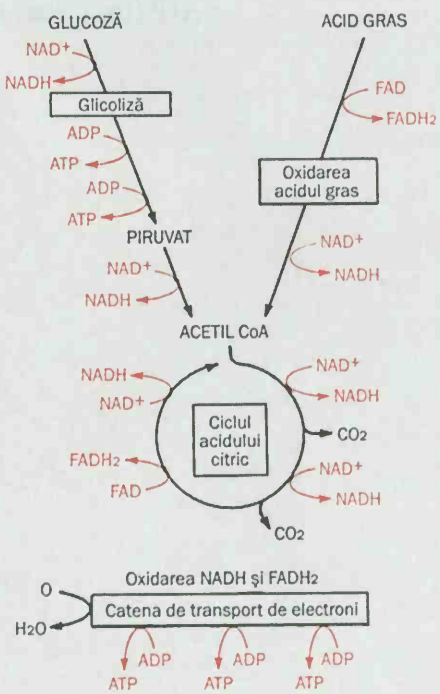


Fig. 9.4. Schema oxidării glucozei şi a acizilor graşi.

anume compartiment al celulei, reacțiile care utilizează NADPH vor decurge în direcția reducerii oricăror cosubstrate. Acesta este un alt procedeu utilizat pentru a direcționa reacțiile biosintetice. Aceste concepte sunt rezumate în fig. 9.2.

Produșii finali ai biosintezei sunt de două tipuri: componenți structurali și compuși ce stochează energie (compuși de rezervă). Așa cum se prezintă în fig. 9.3, există o continuă sinteză și degradare a tuturor acestor componente, intermediarii cei mai importanți fiind aminoacizii, glucoza și acizii grași. O etapă importantă, indicată cu săgeata roșie în fig. 9.3, cu implicații fundamentale pentru interacțiunile metabolismului glucidic și lipidic, este aceea că, odată ce piruvatul, compus din trei atomi de carbon, a fost convertit la radicalul acetil cu doi atomi de carbon (acetil Coenzima A), nu mai este posibil ca acesta să fie utilizat pentru biosinteza glucidelor.

CĂILE OXIDATIVE MAJORE ALE CELULEI

Căile care generează cea mai mare parte a ATP și NADH formate în celulă, rezumate în fig. 9.4, sunt:

- Glicoliza
- Oxidarea acizilor grași
- Ciclul acidului citric (ATC)
- Catena de transport de electroni cuplată cu fosforilarea oxidativă

Dintre cele două substrate inițiale ale acestor două procese, acizii grași se găsesc într-o stare considerabil mai redusă decât glucoza (fig. 9.5) deoarece majoritatea atomilor de carbon pe care îi conțin sunt complet reduși în timp ce toți atomii de carbon ai glucozei poartă deja un atom de oxigen. La arderea totală a lipidelor se produce o energie de 37 kJ g^{-1} în timp ce pentru glucide cantitatea de energie este de 16 kJ g^{-1} (fig. 9.6). De aceea lipidele furnizează o formă mai condensată a energiei stocate decât glucidele iar rezervele de energie ale animalelor bine hrănite constau mai ales în țesutul lor adipos.

β-OXIDAREA ACIZILOR GRAȘI

Acizii grași sunt oxidați în mitocondrii. Acizii grași sunt degradați pas cu pas prin îndepărtarea secvențială a unei unități formată din doi atomi de carbon. Primul pas al oxidării este fixarea Coenzimei A (CoA) la gruparea carboxil a acidului gras și formarea derivaților acid gras CoA. Fiecare unitate cu doi atomi de carbon este eliberată din acidul gras sub formă de acetil CoA. Mecanismul este rezumat în fig. 9.7 în care este inserată și succesiunea de reacții care au loc pentru îndepărtarea fiecărei unități cu doi atomi de carbon. Mai întâi se introduce o legătură

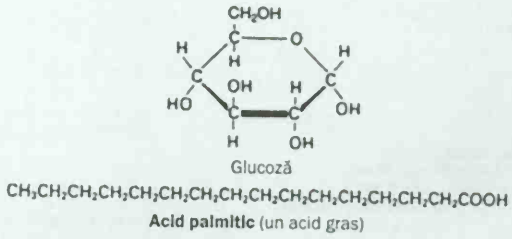


Fig. 9.5. Glucoza se găsește într-o stare mai oxidată decât acidul palmitic.

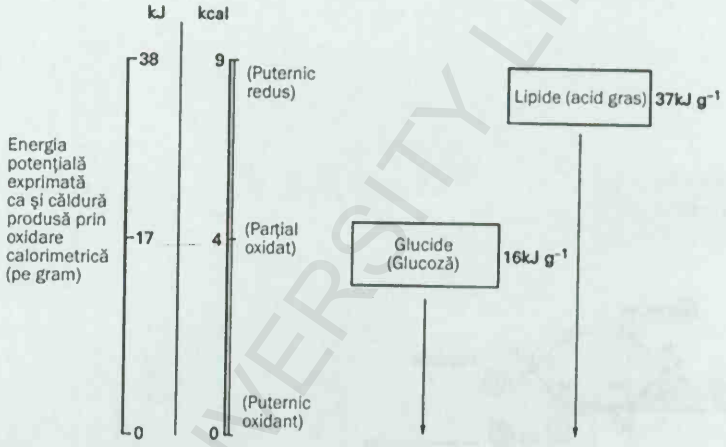
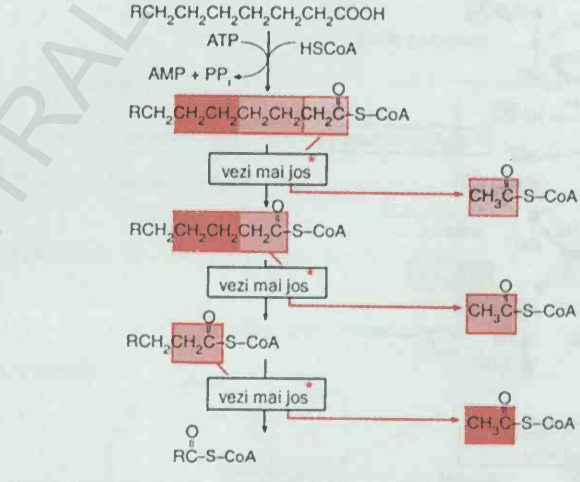


Fig. 9.6. Oxidarea acizilor grași eliberează mai multă energie decât oxidarea glucozei.



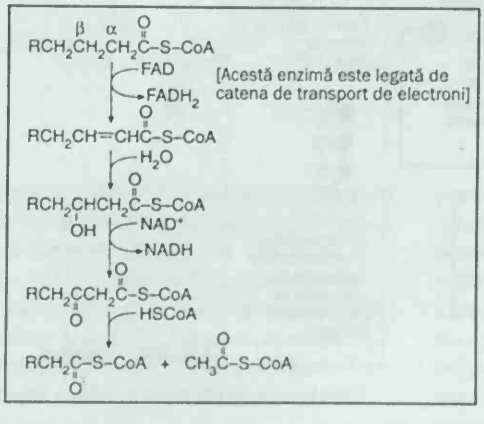


Fig. 9.7. Catabolismul acizilor grași prin β-oxidare.

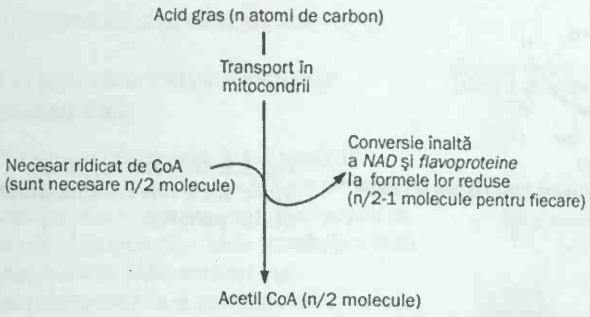


Fig. 9.8. Dintr-un acid gras cu *n* atomi de carbon se formează *n*/2 molecule de acetil CoA.

dublă la carbonul din poziția β (de aici şi denumirea procesului) de către o flavoproteină care este o proteină a membranei mitocondriale interne. Aceasta este urmată de o adiție a apei la legătura dublă, oxidarea grupării alcoolice secundară la grupare carbonil şi scindarea moleculei în prezența CoA cu formarea acetil CoA şi a unui acid gras CoA mai scurt cu doi atomi de carbon decât acidul gras inițial. Flavoproteina acid gras CoA dehidrogenaza, care inițiază procesul de oxidare, cedează doi electroni în catena de respirație aşa cum este indicat în fig. 9.7 (în chenar) iar oxidarea grupării alcoolice secundară produce o moleculă de NADH. Amândouă procesele duc la formarea de ATP prin fosforilare oxidativă, aşa cum este descris mai jos. Procesul integral necesită furnizarea unui număr de molecule de CoA egal cu jumătate din numărul atomilor de carbon pe care îi conține acidul gras inițial (fig. 9.8).

GLICOLIZA

Oxidarea glucozei la piruvat poartă numele de glicoliză. Aşa cum se arată în fig. 9.9, în prima reacție a aceste căi se produce fosforilarea glucozei la C-6 sub acțiunea unei hexokinaze. Glucozo-6-fosfatul rezultat este convertit la fructozo-6-fosfat de către o glucozo-6-fosfat izomerază iar apoi se formează fructozo-1,6-difosfatul, sub acțiunea unei fosfofructokinaze. Sub acțiunea aldolazei are loc scindarea fructozo-1,6-difosfatului în doi compuşi cu trei atomi de carbon: gliceraldehid-3-fosfat şi dihidroxiaceton-fosfat. Aceste două molecule sunt într-un echilibru catalizat de o triozo-fosfat-izomerază. Gliceraldehid-3-fosfatul este convertit la 1,3-difosfoglicerat, printr-o reacție ce implică oxidarea grupării aldehidice de la C-1 la grupare carboxil şi fixarea unui rest fosfat sub formă de anhidridă. Ambele reacții se realizează printr-un singur mecanism enzimatic, utilizând ortofosfatul ca substrat pentru fosforilare. Această etapă remarcabilă produce o moleculă cu un potențial foarte înalt pentru reacția următoare, potențial care este imediat utilizat pentru formarea ATP şi gliceraldehid-3-fosfat. Formarea legăturii de tip anhidridă fosforică din ATP, sub acțiunea unei enzime din citosol, este denumită fosforilare a substratului, pentru a o deosebi de fosforilarea oxidativă.

După conversia 3-fosfogliceratului la 2-fosfoglicerat, intră în joc un alt mecanism remarcabil care determină din nou o fosforilare a substratului. Enzima numită enolază catalizează reacția de eliminare a apei între atomii C-2 şi C-3 şi în consecință creează un alt fosfat reactiv care este imediat utilizat în fosforilarea ADP la ATP. Astfel, aşa cum se schițează

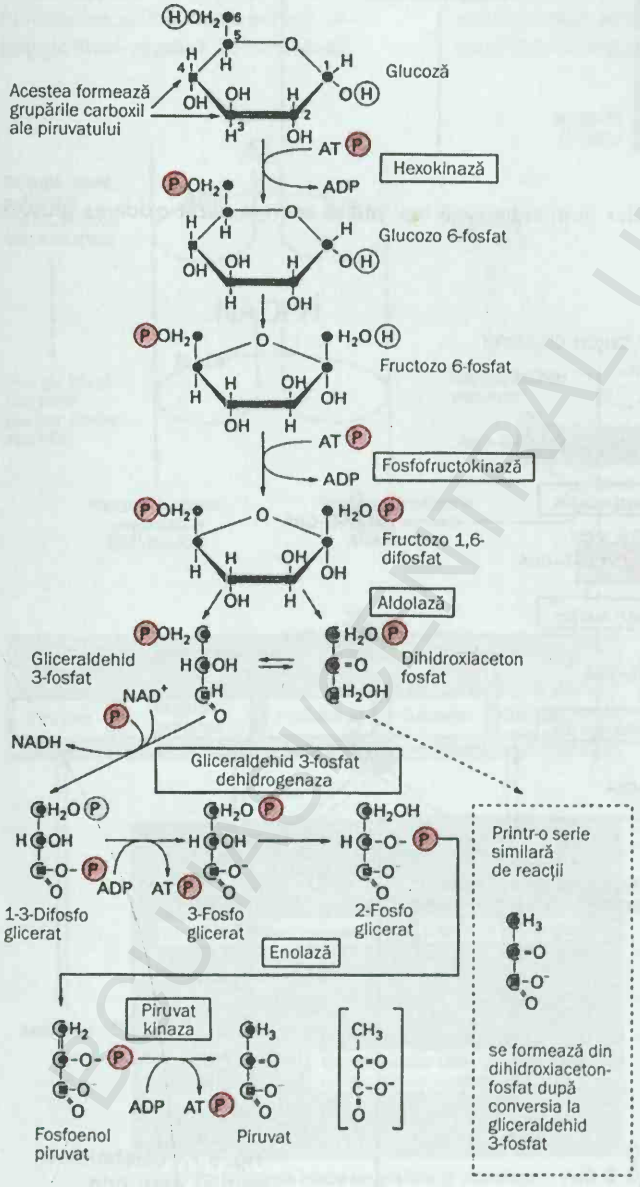


Fig. 9.9. Glicoliza.

în fig. 9.10, glicoliza are un randament net de două molecule de ATP. În plus, se produce o moleculă de NADH care, dacă atomii de hidrogen sunt transportaţi în mitocondrii pe calea mediată de glicerofosfat (a se vedea p. 130), poate da naştere la încă trei molecule de ATP, prin fosforilarea oxidativă.

REACŢIILE PIRUVATULUI

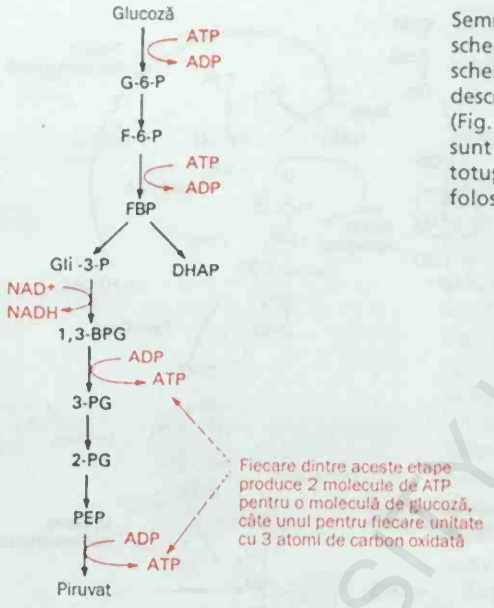
Pentru a putea fi metabolizat în continuare, piruvatul produs prin glicoliză trebuie să fie convertit la acetil CoA (fig. 9.11). Transformarea se realizează prin intervenţia enzimei numită piruvat dehidrogenază. Această enzimă este un complex format din trei subunităţi iar reacţiile catalizate au fost deja prezentate în secţiunea dedicată tiamindifosfatului (p. 94). În plus, piruvatul poate fi convertit în oxalilacetat de către piruvat carboxilază, reacţie ce necesită biotină (descrisă mai amănunţit la p. 95). Reglarea acestor activităţi va fi discutată într-un capitol ulterior (Capitolul 13).

METABOLISMUL LACTATULUI

Lactatul este produs de către celulele roşii ale sângelui ca şi produs final al glicolizei, cale de care eritrocitele depind pentru formarea ATP. Deoarece aceste celule nu conţin mitocondrii, NADH format sub acţiunea gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazei nu poate fi oxidat prin lanţul respirator şi reacţionează cu piruvatul pentru a forma lactatul. Această reacţie este catalizată de către lactat dehidrogenază care în consecinţă regenerează NAD^+ pentru desfăşurarea continuă a glicolizei, aşa cum se arată în fig. 9. 12.

O situaţie similară se întâlneşte în muşchi atunci când activitatea musculară este atât de intensă încât cantitatea de NADH produsă depăşeşte capacitatea mitocondriilor musculare de a îl oxida, proces ce poartă numele de oxidare anaerobă. Trebuie apreciat că un sprinter utilizează de fapt de circa zece ori mai mult oxigen în timpul sprintului decât în rest. În ciuda acestui fapt, lactatul produs este în exces faţă de cantitatea care poate fi oxidată.

Lactatul produs în muşchi este preluat din sânge de către ficat şi utilizat ca substrat pentru gluconeogeneză, aşa cum se indică la p. 136.



Semnificaţia prescurtărilor folosite în schemă poate fi determinată comparând schema cu mai multe căi de reacţie descrisă în detaliu pe pagina opusă (Fig. 9.9). Notaţi că aceste prescurtări nu sunt recomandate în publicaţii. Ele sunt, totuşi, foarte convenabile pentru folosire uzuală.

Fig. 9. 10 Fiecare moleculă de glucoză oxidată prin glicoliză produce 2 ATP

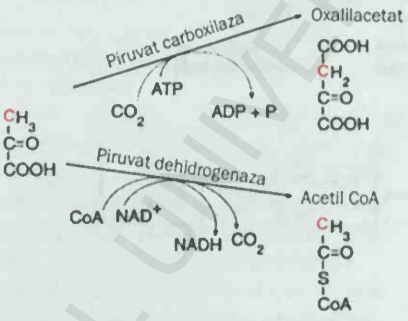


Fig. 9.11. Piruvatul este metabolizat la acetil CoA de către piruvat dehidrogenază şi la oxalilacetat de către piruvat carboxilază.

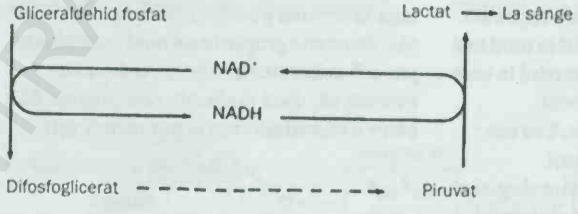


Fig. 9.12. Lactat dehidrogenaza reduce NAD^+ la NADH pentru a susţine desfăşurarea glicolizei în metabolismul anaerob.

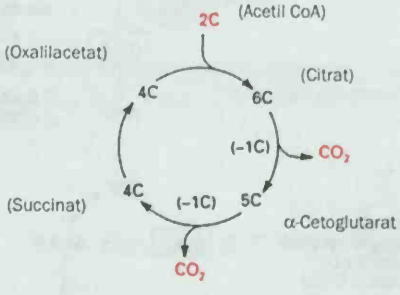


Fig. 9.13. Doi atomi de carbon sunt îndepărtaţi sub formă de CO_2 în fiecare rotire a ciclului acidului citric.

CICLUL ACIDULUI CITRIC

BILANŢUL CICLULUI ACIDULUI CITRIC

Oxalilacetatul se condensează cu acetil CoA pentru a forma citratul, şi o succesiune de enzime acţionează apoi asupra citratului pentru a-l converti în oxalilacetat. Prin acest proces se îndepărtează doi atomi de carbon sub formă de CO_2 aşa cum se arată în fig. 9. 13. În plus, se îndepărtează şi opt atomi de hidrogen. Oxalilacetatul, care este refăcut în acest fel, reacţionează cu o altă moleculă de acetil CoA şi procesul se repetă. Astfel, o moleculă de oxalilacetat poate participa la oxidarea unui număr infinit de molecule de acetil CoA. Este ca şi cum oxalilacetatul ar fi un catalizator, regenerat în mod continuu, după fiecare tură a secvenţei de reacţii. Aşa cum se va explica mai jos, atomii de hidrogen care sunt îndepărtaţi pot fi oxidaţi prin catena de respiraţie, producând ATP. Această

BCU ASSENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

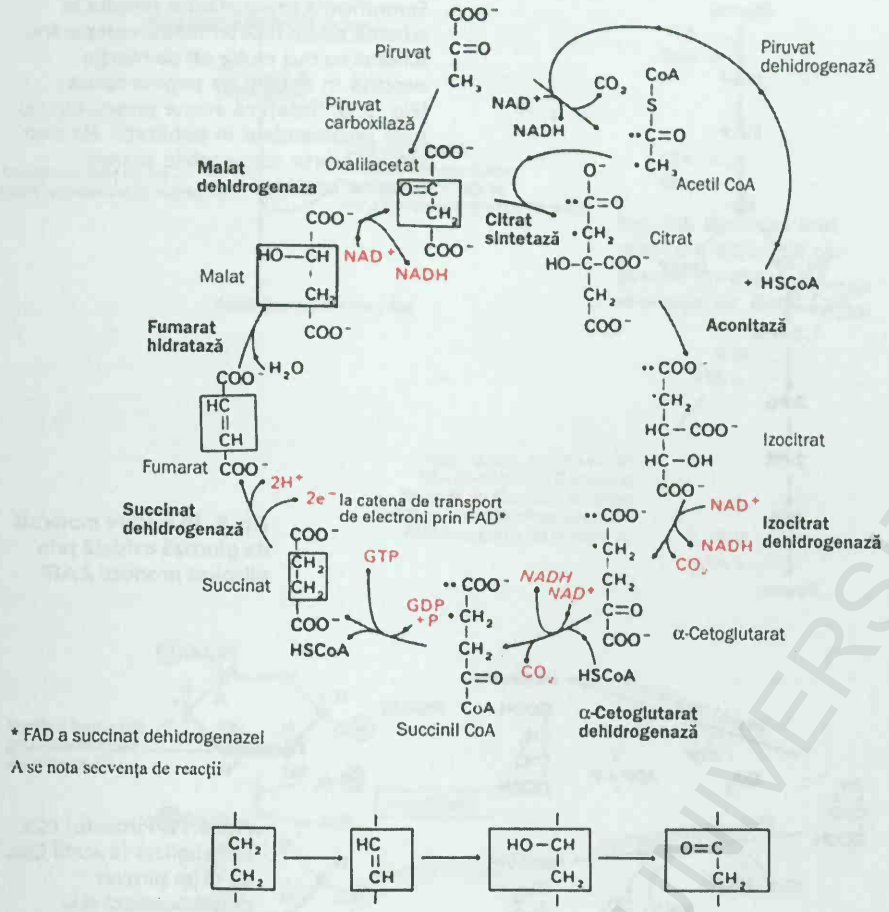


Fig. 9.14. Reacțiile ciclului acidului citric.

secvență de reacții are loc în principiu în toate tipurile de celule, cu rare excepții cum sunt eritrocitele. Ciclul este redat în mod mai detaliat în fig. 9. 14. A se nota modul în care oxidarea succinatului la oxalilacetat, prezentată în chenar, este similară cu cea implicată în oxidarea acizilor grași.

Un progres important al enzimologiei a fost realizat prin studiul citrat sintetazei, enzima care formează citrat, din oxalilacetat și acetil CoA. Citratul este o moleculă achirală (p. 9), având un plan de simetrie.

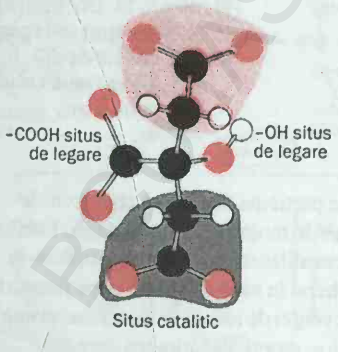


Fig. 9.15. Acidul citric este metabolizat stereospecific.

La prima vedere ar părea că el se poate lega la enzimă pe oricare dintre cele două căi, deoarece grupările carboxil marginale par a fi echivalente. Totuși, a devenit evident că, dacă molecula este prezentată către o suprafață care poate recunoaște atât gruparea hidroxil cât și gruparea carboxil de la atomul de carbon central, astfel încât ele să se poată lega doar la un situs unic, atunci cele două grupări carboxil marginale devin diferite, aceeași grupare carboxil legându-se întotdeauna la același situs catalitic (fig. 9.15).

INTERACȚIUNILE GLICOLIZEI ȘI CICLULUI ACIDULUI CITRIC CU ALTE CĂI METABOLICE

Aceste două procese oxidative funcționează deasemenea ca și legături cu alte procese metabolice. În câteva cazuri, enzimele glicolizei leagă această cale cu alte procese implicate în biosinteza acizilor grași și triacilgliceroliilor, și cu metabolismul aminoacizilor. Aceste conexiuni sunt indicate în fig. 9.16. Ciclul acidului citric acționează deasemenea ca și punct de joncțiune a metabolismului glucidelor, lipidelor și aminoacizilor, așa cum se arată în fig. 9.17. În mod special, oxalilacetatul este un compus cheie în glicoliză și gluconeogeneză, iar oxalilacetatul și α-cetoglutaratul fac legătura cu metabolismul aminoacizilor. Citratul este exportat din mitocondrii pentru lipogeneză.

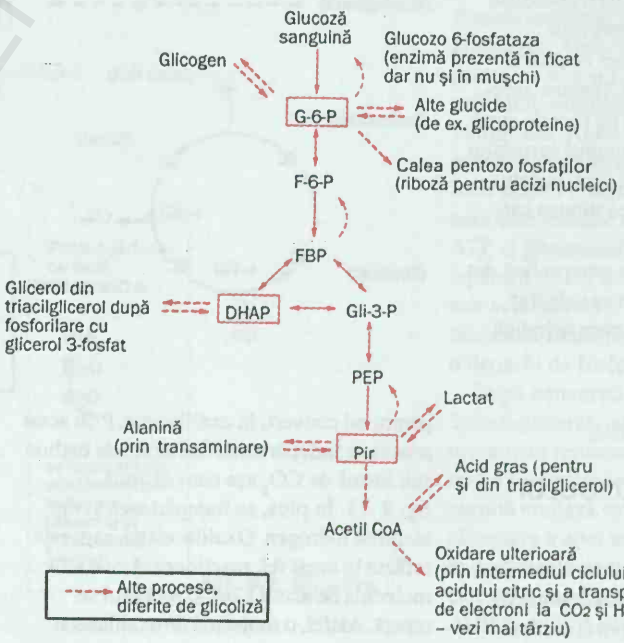


Fig. 9.16. Glicoliza interconectează metabolismul lipidelor și proteinelor.

LANȚUL TRANSPORTOR DE ELECTRONI

ASPECTE STRUCTURALE ALE MITOCONDRIEI ȘI ALE LANȚULUI TRANSPORTOR DE ELECTRONI

Mitocondriile au un compartiment intern, cunoscut sub numele de matrice, care este înconjurat de o membrană numită membrana internă, așa cum se arată în

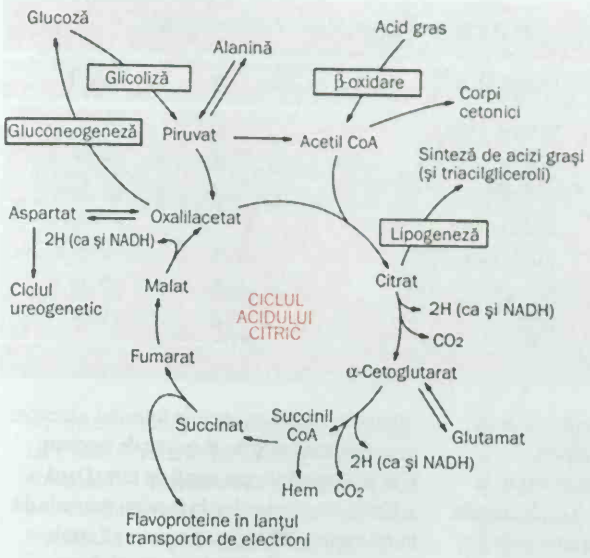


Fig. 9.17. Ciclul acidului citric acţionează ca un centru de legătură între metabolismul proteic, glucidic şi lipidic.

fig. 9. 18 (şi vezi Capitolul 1). Cele mai multe enzime ale catenei de respiraţie sunt proteine integrale ale membranei interne. Există şi o membrană externă, care înconjoară întreaga mitocondrie, iar spaţiul dintre membrana internă şi externă este denumit spaţiu intermembranar. Membrana internă se pliază înspre matrice pentru a forma spaţii intermembranare ce penetrează spre porţiunea centrală a mitocondriei. Aceste pliuri (invaginări) poartă numele de criste (vezi imaginea din p. 3).

Membrana internă nu este liber permeabilă dar conţine enzime de transport care translocă ATP, ADP şi alţi anioni (a se vedea p. 130). NADH şi alte nucleotide cu nicotinamidă nu pot traversa membrana internă. Membrana externă este liber permeabilă pentru ATP, ADP şi alte molecule mici.

Într-o reprezentare simplă, transportul de electroni implică îndepărtarea atomilor de hidrogen de la substrate oxidabile, în special NADH, succinat şi acizi graşi. Aceşti atomi de hidrogen intră în catena de respiraţie, un sistem de complecşi legaţi de membrană (fig. 9.19) şi fiecare este repede scindat formând un proton şi un electron. Electronii trec printr-o serie de enzime numite citocromi şi în final reacţionează cu oxigenul molecular (O_2) şi cu protonii eliberaţi anterior pentru a forma apa. Fig. 9.19 oferă o schemă a acestui proces pentru NADH şi succinat.

OXIDAREA NADH ŞI SUCCINATULUI

NADH produs în ciclul acidului citric difuzează în catena de respiraţie unde o flavoproteină, NADH dehidrogenaza, îl oxidează la NAD$^+$. Aceasta implică transferul unui ion hidrură la o enzimă flavinică, în acest caz FMN, care poate deasemenea să accepte un proton pentru a forma $FMNH_2$. Un ion hidrură constă într-un nucleu de hidrogen cu doi electroni asociaţi şi poate fi notat H$^-$. Aceşti ioni nu au o existenţă independentă, dar uneori reprezintă entitatea transferată în procesele biologice de reducere, aşa cum este cazul şi aici.

Succinat dehidrogenaza, enzima ciclului acidului citric care converteşte succinatul în fumarat, este o proteină integrală a membranei interne a mitocondriei, asociată cu enzime ale lanţului respirator. Este o flavoproteină, ce conţine FAD ca şi coenzimă, şi este singura enzimă a ciclului acidului citric care este legată de membrană şi care leagă direct acest ciclu de lanţul respirator.

$FMNH_2$ şi $FADH_2$ sunt oxidate de către enzime ce transferă atomi de hidrogen unei molecule de ubichinonă, cunoscută şi sub numele de coenzimă Q (abreviată cu Q), care astfel formează ubichinona redusă (QH_2, numit ubichinol). Structura acestor compuşi este prezentată în fig. 9.20.

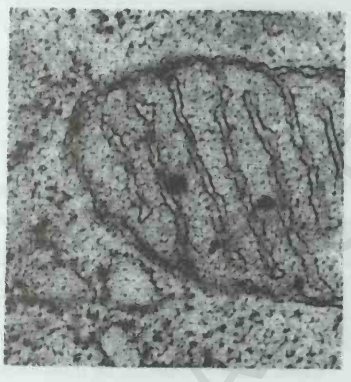


Fig. 9.18. Ultrastructura unei mitocondrii.

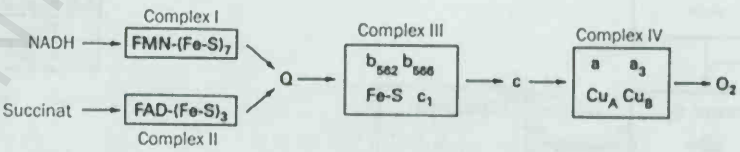
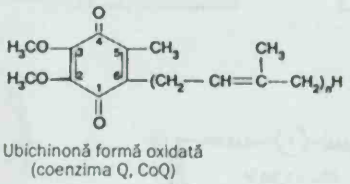
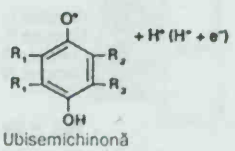


Fig. 9.19. Schema lanţului transportor de electroni. Citocromii sunt reprezentaţi prin b_{562}, b_{566}, c_1, c, a şi a_3. Fe-S sunt complecşi proteici cu fer şi sulf. Cu reprezintă ionii de cupru.





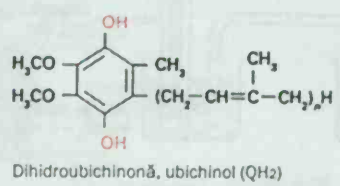


Fig. 9.20. Structura ubichinonei.

Ubichinonele acceptă de asemenea atomi de hidrogen transferați de la alte molecule care au fost oxidate prin catena de respirație, ca în β-oxidare sau oxidarea glicerol-3-fosfatului. Ubichinonele sunt molecule liposolubile capabile să difuzeze prin domeniul hidrofob al membranei interne, dar sunt de asemenea legate ca și componente în complexele II și III, funcționând în aceste sisteme (vezi mai jos). Ubichinonele au și proprietatea de a forma o semichinonă, ubisemichinona, prezentată în fig. 9. 20. Aceasta facilitează tranziția de la transferul a doi electroni la transferul unui singur electron, etapă necesară pentru ca un electron să treacă la următoarele enzime ale catenei, citocromii.

CITOCROMII ȘI POTENȚIALELE LOR REDOX

Enzimele cunoscute sub numele de citocromi au fost descoperite în anii 1930. În acea perioadă, se folosea frecvent un spectroscop manual pentru a determina absorbția în domeniul luminii vizibile. În zona de lungimi de undă în care era absorbită lumina, în spectru apărea o bandă întunecată. Citocromii au fost denumiți astfel fiindcă erau cromofori celulari care determinau apariția acestor benzi de absorbție. Fiecare citocrom constă dintr-un ansamblu structural de subunități proteice care adăpostesc una sau mai multe molecule de hem, adeseori împreună cu un complex cu fer și sulf sau, în cazul citocrom *c* oxidazei, cu ioni de cupru. Hemul citocromic este înrudit structural cu hemul din hemoglobină, doar

Tabelul 9.1. Potențialele redox ale componentelor catenei de respirație

Oxidant	Reducător	*n*	E'_0 (V)
NAD^+	NADH + H^+	2	-0,32
Fumarat	Succinat	2	+0,32
Ubichinonă (oxidată)	Ubichinol	2	+0,10
Citocrom b (3+)	Citocrom b (2+)	1	+0,07
Citocrom c (3+)	Citocrom c (2+)	1	+0,22
Citocrom a (3+)	Citocrom a (2+)	1	+0,29
$½O_2$ + $2H^+$	H_2O	2	+0,82

n este numărul de electroni

că în citocromi ionul de fer suferă oxidări și reduceri între forma feroasă și ferică, deoarece electronii trec de la un citocrom la altul, așa cum se arată în fig. 9. 21. Hemul din citocromul *b*, la fel ca și cel din citocromul *c*, este identic cu cel din hemoglobină dar în ultimul caz, grupările vinil sunt implicate în legarea unui rest de cisteină din proteină. În hemul din citocromul *a* există diferențe în catenele laterale ale hemului.

Așa cum se întâmplă în orice reacție enzimatică, reacția unui citocrom cu alt citocrom implică o modificare a energiei libere. Această modificare a energiei libere crează potențialul pentru fosforilarea ADP la ATP care este asociată cu transportul electronilor în celula în funcțiune. Reacțiile ce au loc între componentele lanțului respirator de transport de electroni poate fi demonstrat *in vitro*. Fig. 9.22 prezintă un aparat cu care poate fi măsurată diferența de potențial între două soluții, în două semi-celule folosind electrozi ce conectează cele două soluții de reactanți prin intermediul unei punți de sare. Dacă o astfel de reacție are loc în condiții normale de temperatură (298 K) și presiune (1 atm), folosind o soluție 1M de reactanți, forța electromotoare, așa cum este reprezentată de voltajul înregistrat de voltmetru, este un indicator al potențialului standard de oxidoreducere al reacției, sau potențial redox standard (E'_0). Prin convenție. potențialul redox standard al cuplului H^+: H_2 (1 M H^+ în echilibru cu H_2 gazos la 1 atm) este definit ca potențial 0 V, și toate celelalte potențiale redox se pot corela cu acesta. Folosind o astfel de tehnică, potențialul standard de oxidoreducere poate fi determinat și unele dintre aceste potențiale sunt redate în tabelul 9. 1. Variația energiei libere standard $\Delta G^{0'}$ este dependentă de variația potențialului de oxidare standard ΔE, prin ecuația: $\Delta G^{0'} = nF\ \Delta E'_0$

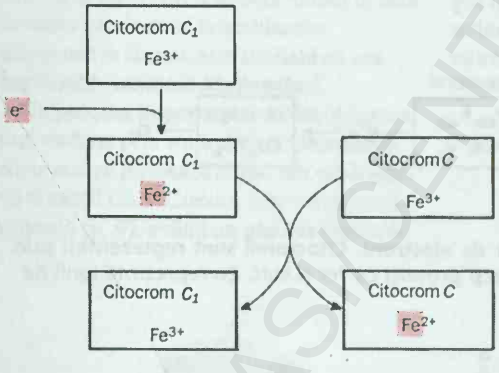


Fig. 9.21. Electronii trec de hemul unui citocrom la hemul altui citocrom.

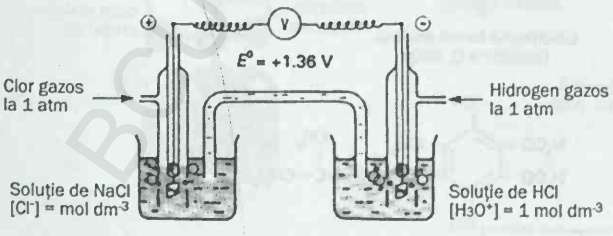
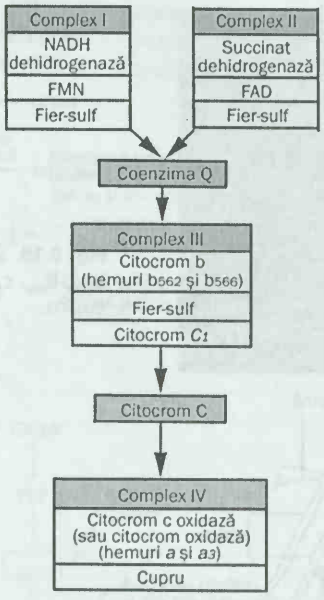


Fig. 9.22. Măsurarea potențialelor redox.



Complex I : NADH: ubichinon oxidoreductază
Complex II : Succinat: ubichinon oxidoreductază
Complex III : Ubichinol: citocrom c oxidoreductază
Complex IV : Ferocitocrom c: oxigen oxidoreductază

Fig. 9.23. Complecșii lanțului transportor de electroni.

BCU IAȘI CENTRALĂ FIRST LIBRARY

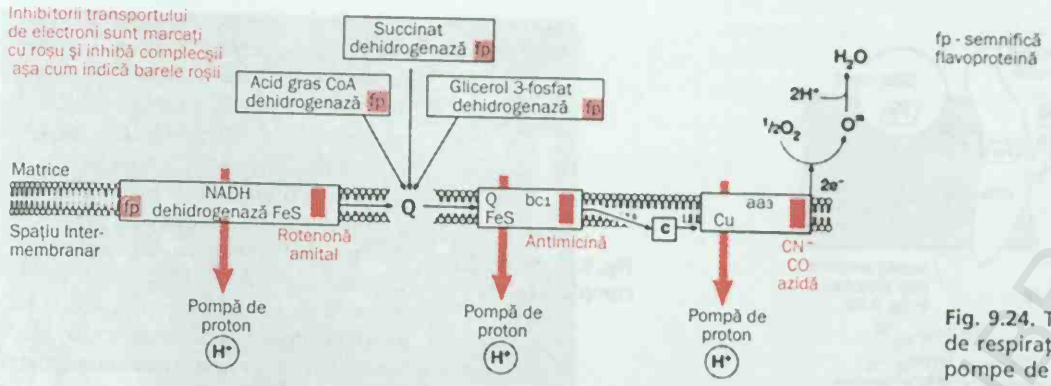


Fig. 9.24. Trei complecşi ai catenei de respiraţie acţionează ca şi pompe de protoni.

unde *n* este numărul de electroni implicaţi iar *F* este constanta lui Faraday (96 500 coulombi). Unitatea de măsură pentru FΔE este coulomb-volt sau joule (4,18 J = 1 cal). Potenţialul energetic total al lanţului respirator este de 1.14 V. În consecinţă, variaţia energiei libere standard asociată cu oxidarea unui mol de NADH poate fi calculată astfel:

$\Delta G^{0'}$=(-2 x 96500 x 1,14)/4,18 =
-52,6 kcal mol^{-1} = -220 kJ mol^{-1}

ORGANIZAREA ŞI COMPONENTELE LANŢULUI TRANSPORTOR DE ELECTRONI

Încercările de a izola componentele lanţului de transport al electronilor au revelat natura complecşilor în interiorul cărora aceştia sunt conţinuţi. Utilizând metode blânde de solubilizare, au fost separaţi patru complecşi, aşa cum se arată fig. 9.23. Dovezile disponibile indică faptul că ordinea în care componentele izolate reacţionează este cea prezentată în această figură. NADH şi succinatul sunt oxidate de către complecşii I şi respectiv II, reducând ubichinona. Electronii trec apoi prin complexul III, citocromul *c* şi complexul IV, complexul IV fiind apoi oxidat de către O_2.

ACTIVITATEA DE POMPE DE PROTONI A COMPONENTELOR LANŢULUI TRANSPORTOR DE ELECTRONI

Aşa cum s-a explicat mai sus, o trăsătură a procesului de oxidare este scindarea atomilor de hidrogen în protoni şi electroni. Acest proces este important pentru formarea ATP prin procesul de fosforilare oxidativă, aşa cum se explică mai jos. Ca o parte a acestui proces, protonii eliberaţi sunt pompaţi afară din membrana internă, în spaţiul intermembranar, aşa cum se arată în fig. 9. 24. Complecşii I, III şi IV pot funcţiona ca pompe care preiau protoni şi prin aceasta creează un gradient chimic şi electric pe cele două feţe ale membranei. Acea faţă a membranei interne spre care protonii sunt pompaţi este uneori denumită faţa P (P însemnând pozitiv) iar faţa dinspre matrice a membranei e denumită faţa N (N de la negativ). Multe dintre cunoştinţele despre funcţionarea catenei de respiraţie au fost obţinute prin utilizarea inhibitorilor, locurile de acţiune ale câtorva dintre aceştia fiind prezentate în fig. 9. 24.

STRUCTURA COMPLECŞILOR I ŞI II

Fig. 9. 25 prezintă o reprezentare a complexului I. El are un domeniu globular şi domenii intrinsece membranare care se găsesc în interiorul stratului dublu lipidic, indicat prin linii albe. Complexul I este alcătuit din 40 de subunităţi dar o structură detaliată lipseşte. El poate fi împărţit în trei fracţii cunoscute ca: flavoproteina ce poartă coenzima FMN, proteina cu fer şi sulf ce conţine şapte grupuri fier-sulf de tip „cluster" şi proteina hidrofobă.

Complexul II este din punct de vedere structural mai simplu decât complexul I şi cuprinde patru subunităţi. După cum se arată în fig. 9. 26, acestea sunt flavoproteine ce poartă un grup His-FAD şi subunitatea fer-sulf ce poartă cele trei grupuri 2Fe-2S, 3Fe-4S şi 4Fe-4S. În plus există două polipeptide membranare integrale care ancorează subunităţile hidrofile şi care conţin locuri de legare pentru ubichinone.

MECANISMUL TRANSPORTULUI DE ELECTRONI ÎN COMPLEXUL III

Citocromul *b* conţine două molecule de hem iar transferul de electroni în acest punct este complicat. O structură generalizată pentru complexul III este prezentată în fig. 9.27. Complexul conţine legate de asemenea

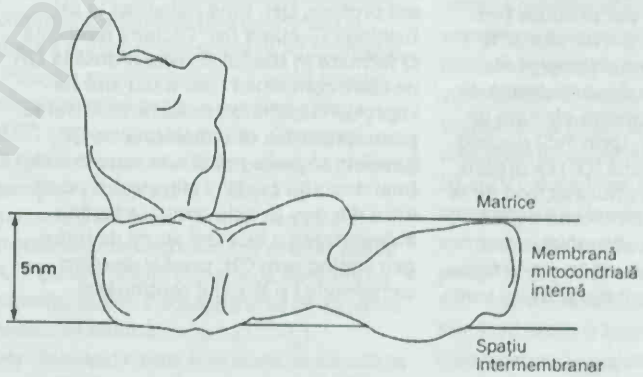


Fig. 9.25. Schema structurii complexului I.

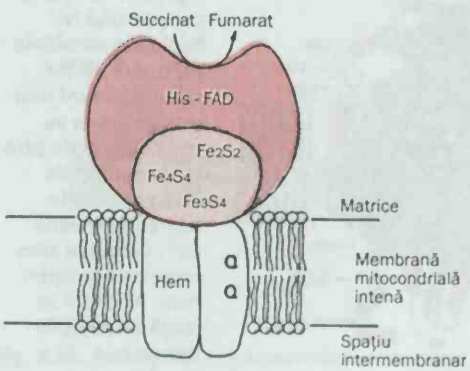


Fig. 9.26. Structura complexului II.

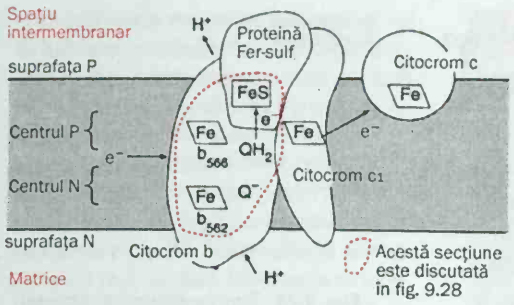


Fig. 9.27. Structura complexului III.

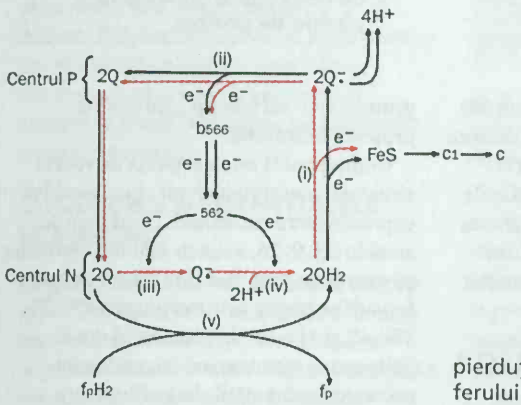


Fig. 9.28. Mecanismul complexului III. Se știe de mulți ani, din rezultatele experimentelor cinetice în care au fost măsurate rata de oxidare și de reducere a citocromilor, că citocromul *b* nu transferă direct electroni citocromului c_1. Ca rezultat al acestui experiment și al altor experimente a fost propus ciclul Q al transportului protonic ca fiind compatibil cu fenomenele observate. Pentru a descrie acest ciclu, trebuie ca cele două molecule de ubichinol (QH_2) să intre simultan în ciclu. Una dintre aceste molecule s-ar produce prin acțiunea complecșilor I și II iar alta ar fi fost generată printr-un tur complet al ciclului precedent. Cele două molecule de QH_2 furnizează fiecare dintre ele câte un electron citocromului c_1 (prin FeS) ducând la anionul ubisemichinonă ($Q^{\cdot-}$) ca produs al etapei (i). (Pierderea unui electron de la QH_2 implică pierderea simultană a unui proton pentru a forma ubisemichinona ($QH^{\cdot}$), dar aceasta ionizează la pH-ul fiziologic în $Q^{\cdot-}$ și în H^+. Acești doi protoni sunt pierduți de către QH_2 ca rezultat al transferului unui electron). Protonul pierdut ca rezultat al acestei reacții se presupune a fi eliberat în spațiul intermembranar ca parte a mecanismului de pompă de protoni a acestui complex. $Q^{\cdot-}$ este apoi oxidat la ubichinonă prin citocromul b_{566} - etapa (ii). O moleculă de ubichinonă (Q) formată astfel este apoi redusă la ubisemichinonă (care din nou există în forma de anion ($Q^{\cdot-}$) de către un electron de la citocromul b_{562} (care la rândul său a fost redus de către b_{566}) – etapa (iii). Un al doilea electron de la b_{562} reduce mai departe $Q^{\cdot-}$ pentru a forma QH_2 (după acceptarea a doi protoni, QH_2 fiind neionizat la pH fiziologic) – etapa (iv). Cealaltă moleculă Q formată în stadiul (ii) este redusă la QH_2 de către complexul I sau II sau alte flavoprotein ubichinon reductaze. Astfel se poate prevedea că o moleculă de QH_2 (urmând săgeata roșie) este regenerată (mai degrabă ca un catalizator) și poate intra din nou în ciclu pentru a facilita îndepărtarea a încă doi atomi de hidrogen venind prin QH_2 produs de către complexele I și II, ciclul continuând.

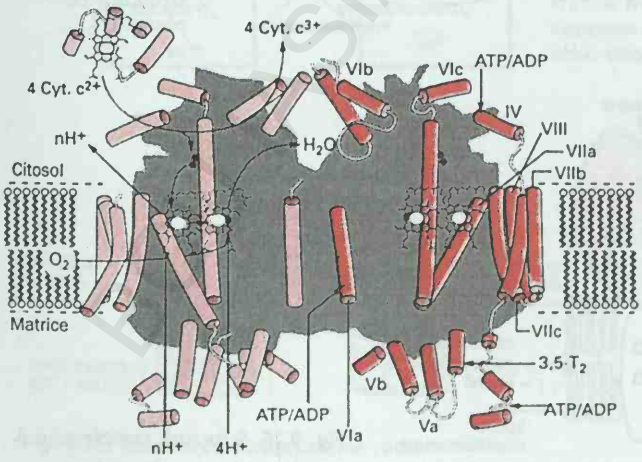


Fig. 9.29. Structura complexului IV. Regiunile elicoidale ale unora dintre subunități sunt indicate, așa cum au fost evidențiate prin cristalografie de raze x. Punctele negre indică ionii Cu^{2+}. Cercurile albe reprezintă grupări hem. ATP/ADP se leagă la pozițiile indicate.

molecule de ubichinone care participă la transferul de electroni printr-un mecanism cunoscut ca ciclul Q, prezentat detaliat în fig. 9. 28. Această figură trebuie să fie explorată numai atât cât e necesar pentru a înțelege procesul global. În esență acesta este un mecanism prin care electronii primiți ca perechi de la NADH sau succinat pot fi transferați câte unul unui citocrom c_1 prin intermediul unui complex fer-sulf FeS. În același timp, protonii sunt transferați în spațiul intermembranar. Detalii referitoare la acest mecanism sunt date în legenda fig. 9.28.

ASPECTE STRUCTURALE ALE COMPLEXULUI IV

Un desen detaliat, reprezentând o structură a complexului IV, este prezentat în fig. 9.29. Proteinele mitocondriale sunt în cele mai multe cazuri codificate de către ADN-ul nuclear și în puține cazuri de către ADN-ul mitocondrial (a se vedea p. 44). Complexul IV are 13 subunități, unele dintre ele fiind indicate în figură prin numere romane. Subunitățile I, II și III, care formează centrul catalitic al complexului, sunt codificate și sintetizate în mitocondrii, în timp ce celelalte zece sunt codificate în nucleu, sintetizate în ribozomii extramitocondriali și importate în mitocondrii. Subunitățile I și II transportă între ele grupări hem care reacționează cu oxigenul molecular la fel ca și ioni de cupru care sunt deasemenea implicați în mecanism. Locul pentru legarea citocromului *c* este de asemenea redat în figură. Acest complex preia patru protoni pentru fiecare pereche de electroni transportați, pentru formarea apei, și pompează alți protoni prin membrană, în spațiul intermembranar.

FOSFORILAREA OXIDATIVĂ

NECESITATEA FOSFORILĂRII OXIDATIVE

Multe tipuri de lucru chimic și fizic necesită aport de ATP. Catabolismul oxidativ este un proces exoterm, iar schimbul important de energie liberă negativă cu care este asociat procesul global poate fi cuplat cu sistemul care fosforilează ADP la ATP. Un astfel de sistem este lanțul transportor de electroni, iar cantitatea totală de energie liberă negativă a acestui proces este suficientă pentru formarea a aproximativ trei molecule de ATP, dacă substratul oxidat este NADH sau două molecule, dacă este oxidat succinatul. Complexul ATP-azelor mitocondriale poate fi vizualizat prin amplificare sub microscopul electronic folosind o colorare negativă cu fosfotungstat (vezi fig. 9.30).

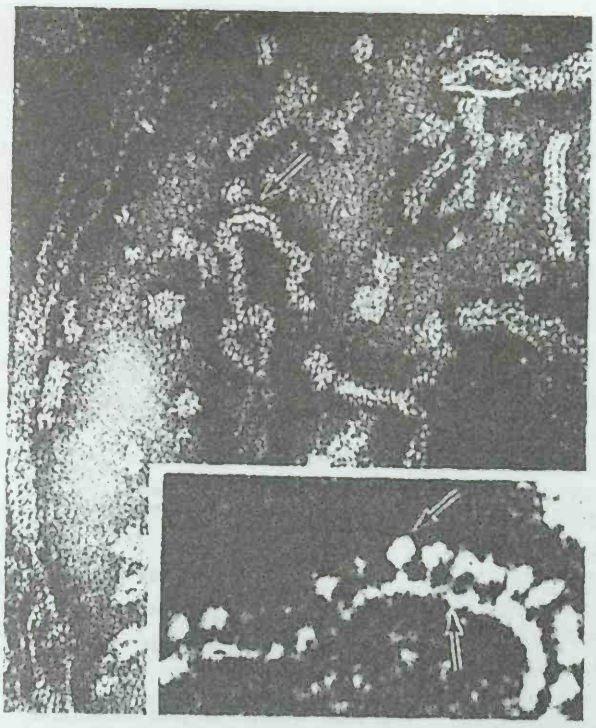


Fig. 9.30. Complexul ATP-azei mitocondriale poate fi vizualizat ca o extruzie din membrana mitocondrială internă (indicat prin săgeți).

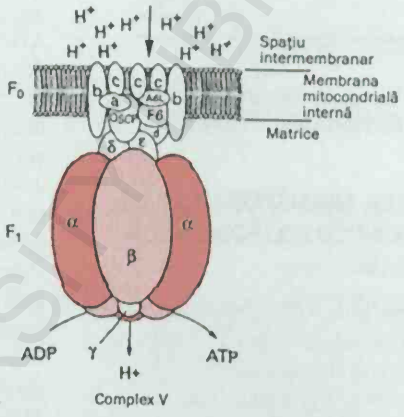


Fig. 9.31. Structura complexului F_0/F_1.

SINTEZA ATP

ATP este sintetizat din ADP și P de către ATP-sintaza transportoare de H^+, a cărei structură generală este prezentată în fig. 9.31. Ea constă din două complexe majore, cunoscute ca F_0 și F_1. Fiecare complex este alcătuit dintr-un număr de subunități, F_0 având șapte la eucariote și F_1 având cinci tipuri diferite de subunități, trei din fiecare α și β, și câte una din fiecare γ, δ și ϵ, în total nouă. Miezul („core") complexului F_1 constă din subunitatea γ înconjurată de către șase subunități α și β dispuse alternativ. Se crede că sinteza ATP implică rotația subunităților αβ în jurul subunității γ. Prin unirea complecșilor F_0 și F_1 se formează o regiune cunoscută ca „trunchi", alcătuită din OSCP (Oligomycin Sensitivity Conferral Protein - proteină care confera sensibilitatea la oligomicină), F_6, d, subunitățile δ și ϵ. Complexul F_0 este alcătuit din 12 subunități c, cu 2 b și câte o subunitate a, respectiv ABL. Structura precisă a F_0 nu este încă complet elucidată. Esențial pentru sinteza ATP este transportul de către complexul F_0/F_1 a protonilor din spațiul intermembranar în matrice. În anumite condiții F_1 poate funcționa ca și ATP-ază, hidrolizând ATP la ADP și P, și a fost înainte considerată ca ATP-aza mitocondrială.

TEORIA CHEMIOSMOTICĂ

O schemă ce rezumă procesul de pompare a protonilor și sinteza ATP este prezentată în fig. 9.32. Pomparea protonilor de către complexele I, III și IV spre exteriorul (fața P) a membranei interne crează o forță proton-motoare ca rezultat al gradientului de protoni și a potențialului electric asociat care este generat prin membrană prin creșterea sarcinii pozitive. Acest potențial electrochimic este menținut prin pomparea continuă a protonilor prin membrană și tinde a fi disipat prin acțiunea ATP sintazei, deoarece această enzimă utilizează energia electrochimică pentru a conduce sinteza ATP, concomitent cu un flux de protoni înapoi spre matrice. Fiecare din locurile de pompare (complexele I, III și IV) pompează suficienți protoni pentru a susține sinteza a aproximativ o moleculă de ATP pentru fiecare pereche de electroni ce parcurge lanțul. Fiecare pereche de electroni reduce un atom de oxigen ($1/2\ O_2$). Stoichiometria poate fi de aceea exprimată ca raport P/O (număr de molecule de fosfat anorganic per $1/2\ O_2$). Acest mecanism este cunoscut ca procesul chemiosmotic.

Când NADH este oxidat, cu toate cele trei puncte de pompare operaționale, raportul P/O este în consecință aproximativ 3. Este posibil să se blocheze lanțul cu antimicină și să se arate că, cu condiția să fie adăugată din exterior o moleculă acceptoare de electroni, complexul I poate întreține fosforilarea oxidativă prin el însuși cu un raport P/O de aproximativ 1. Oxidarea succinatului, în timpul căreia fluxul de electroni parcurge doar două locuri de pompare (complexele III și IV), duce la un raport P/O de aproximativ 2. Aceste valori sunt aproximative deoarece stoichiometria pompării protonilor în raport cu sinteza de ATP este observată cu o precizie de 10 %. Fig. 9.32 poate fi legată de fig. 9.24 pentru a aprecia efectul combinat al fluxului de electroni și fosforilării oxidative.

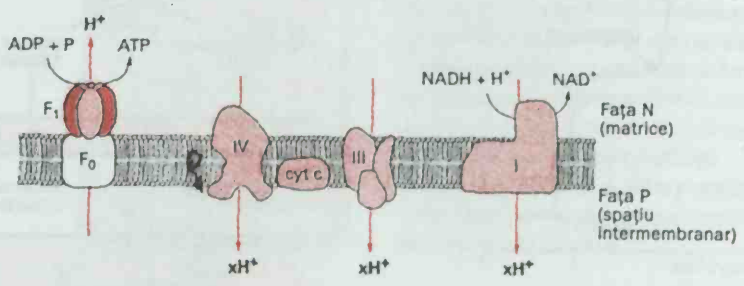


Fig. 9.32. Potențialul chemiosmotic ce conduce la fosforilarea oxidativă.

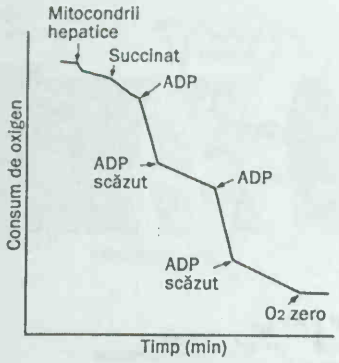


Fig. 9.33. Controlul respiraţei celulare măsurat cu electrodul de oxigen.

CUPLAREA TRANSPORTULUI DE ELECTRONI CU FOSFORILAREA OXIDATIVĂ

Randamentele de ATP reprezentând valori mari ale raportului P/O pot fi obţinute in vitro din preparate mitocondriale relativ nedeteriorate prin procedurile de izolare. În astfel de preparate se spune că fosforilarea oxidativă este puternic cuplată cu transportul de electroni. Un raport ridicat ATP/ADP face ca transportul de electroni şi fosforilarea oxidativă să decurgă mai lent, ceea ce indică faptul că la un cuplaj puternic, rata transportului de electroni este reglată de rata fosforilării ADP. Acest proces poartă numele de control respirator şi poate fi demonstrat prin înregistrarea utilizării oxigenului cu un electrod de oxigen. Efectul diferitelor adausuri asupra mitocondriilor hepatice incubate, în care fosforilarea oxidativă este puternic cuplată cu transportul de electroni, a fost înregistrat iar rezultatul acestui experiment este prezentat în fig. 9.33. Iniţial, utilizarea oxigenului a fost foarte lentă, dar adăugarea succinatului ca substrat a determinat o creştere a acesteia iar adăugarea de ATP a determinat o creştere şi mai rapidă. Aceasta a continuat până când concentraţia ADP a scăzut datorită conversiei la ATP.

Adăugarea ulterioară de ADP a restabilit consumul de oxigen. Cu alte cuvinte, fluxul de electroni a fost controlat de către rata cu care a putut fi sintetizat ATP.

AGENŢI DE DECUPLARE

Anumiţi compuşi pot determina decuplarea fosforilării oxidative de transportul de electroni. În prezenţa unor astfel de compuşi, transportul de electroni se desfăşoară cu viteză maximă dar fosforilarea ADP nu are loc. Se presupune că agenţii de decuplare acţionează prin producerea unei scurgeri de protoni prin membrana internă, în acest fel împiedicând formarea unui gradient electrochimic. Un astfel de compus este 2,4-dinitrofenolul. Fig. 9.34. prezintă un experiment de utilizare a oxigenului de către mitocondrii hepatice aflate iniţial în cuplaj strâns. Adăugarea de succinat şi ADP cauzează un răspuns similar cu cel prezentat în fig. 9.33. Dacă se adaugă apoi oligomicină, utilizarea oxigenului încetează, deoarece oligomicina inhibă ATP sintaza fără a o decupla de transportul de electroni, arătând astfel că în mitocondriile cu cuplaj strâns, blocarea sintezei ATP opreşte fluxul de electroni. Adăugarea apoi a 2,4-dinitrofenolului determină un transport rapid al electronilor şi o utilizare rapidă a oxigenului, dar dacă s-ar încerca măsurarea sintezei ATP s-ar observa că ea nu are loc.

ALTE PROCESE MITOCONDRIALE

TRANSLOCAREA PRIN MEMBRANA MITOCONDRIALĂ INTERNĂ

S-a menţionat anterior că membrana mitocondrială internă este impermeabilă pentru nicotinamidnucleotide, dar conţine sisteme care transportă diferiţi anioni în timp ce, simultan, transportă alte molecule în direcţie opusă, aşa cum se arată în Fig. 9.35 (acest proces e cunoscut ca „antiport" p. 197). Unele dintre aceste perechi de molecule sunt prezentate în tabelul 9.2.

Tabelul 9.2. Substanţe de tip „antiport" care sunt transportate prin membrana mitocondrială

A	B
Piruvat	OH^-
Fosfat	Malat
Citrat	Malat
Fosfat	OH^-
ADP	ATP
Aspartat	Glutamat
Malat	2-oxoglutarat

A şi B conform Fig. 9.35

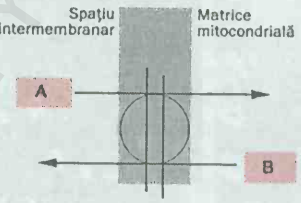


Fig. 9.35. Transportul prin membrana mitocondrială internă prin proces de tip „antiport".

CALEA GLICEROL-3-FOSFATULUI

Transportul hidrogenului din citosol în mitocondrie poate fi mediat de către glicerol 3-fosfat care interacţionează cu o dehidrogenază flavinică în membrana mitocondrială internă. NADH reduce dihidroxiacetonfosfatul formând glicerol 3-fosfatul, reacţie catalizată de glicerol 3-fosfat dehidrogenaza solubilă din citosol. Enzima legată de membrana mitocondrială interacţionează direct cu lanţul transportor de electroni şi atunci când oxidează din nou glicerol-3-fosfatul la dihidroxiacetonfosfat, $FADH_2$ rezultat trece atomii de hidrogen direct complexului III, producând un raport P/O = 2. Reacţia globală este deci oxidarea NADH citosolic de către lanţul transportor de electroni, aşa cum se arată în fig. 9.36.

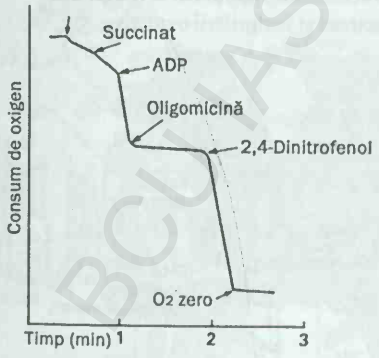


Fig. 9.34. Efectul agenţilor de decuplare asupra respiraţiei.

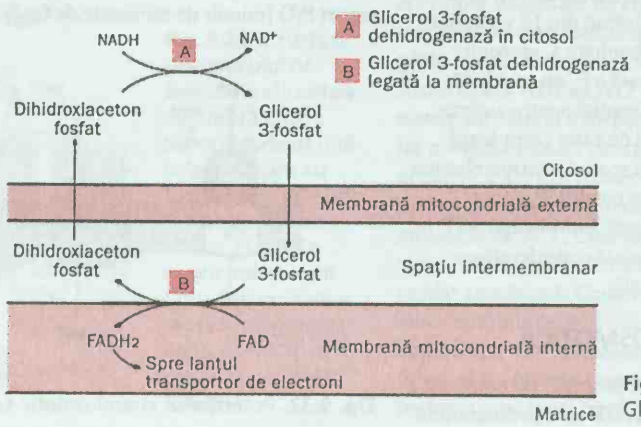


Fig. 9.36. Calea Glicerol-3-fosfatului.

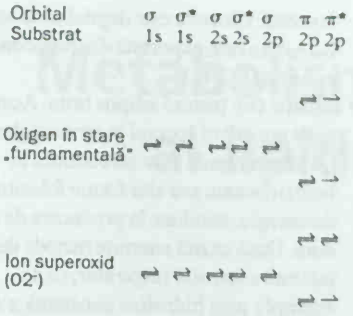


Fig. 9.37. Configurația electronică a speciilor de oxigen.

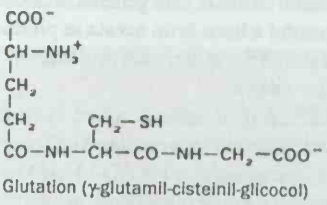


Fig. 9.38. Structura glutationului.

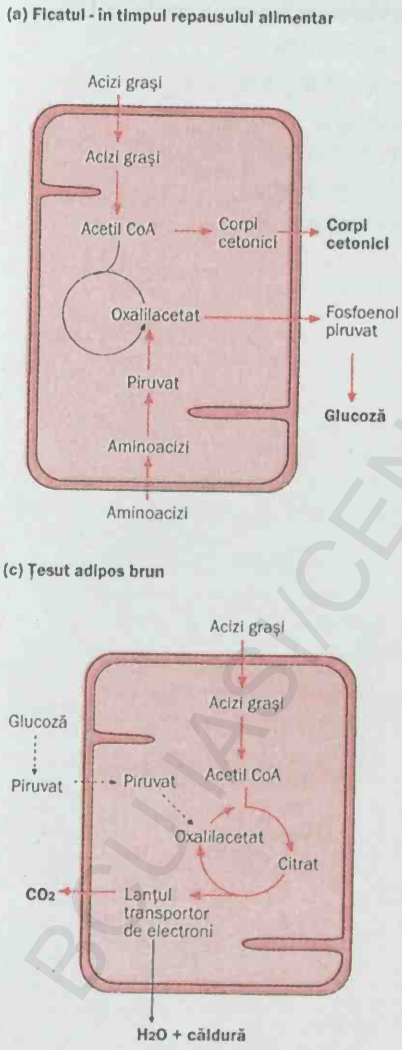


Fig. 9.41. Metabolismul mitocondriilor în diferite țesuturi.

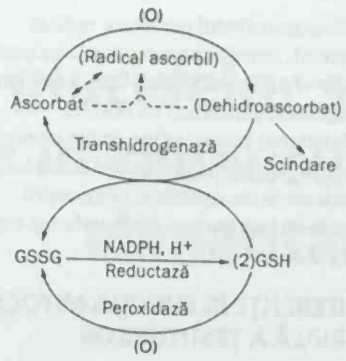


Fig. 9.39. Interacțiunile între glutation și ascorbat.

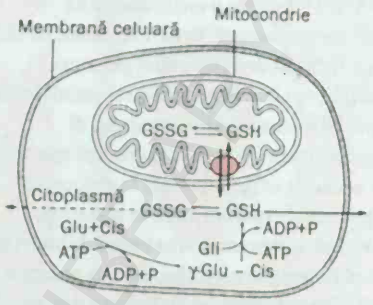


Fig. 9.40. Biosinteza glutationului este catalizată de enzime citoplasmatice specifice.

TOXICITATEA OXIGENULUI

Deși oxigenul este esențial pentru majoritatea formelor de viață, el poate da naștere unor forme moleculare foarte toxice, în special atunci când este prezent ca oxigen hiperbaric – de exemplu oxigen la concentrații mai mari decât concentrația în aer la presiune atmosferică normală. Una dintre cele mai reactive specii este ionul superoxid, un radical liber. Un radical liber este o moleculă ce posedă un electron desperecheat (și deci foarte reactiv). Despre radicalii liberi se va discuta ulterior în legătură cu vitamina E, la p. 175. O altă specie reactivă de oxigen cu reactivitate mare este cunoscută sub numele de oxigen singlet. Se întâlnesc două forme de oxigen singlet: în una amândoi orbitalii π^* 2p sunt ocupați, fiecare dintre ei conținând un electron dar de spin opus unul față de altul; în cealaltă formă numai unul dintre cei doi orbitali π^* 2p este ocupat, conținând doi electroni de spin opus. Configurația electronică a oxigenului în stare fundamentală și a ionului superoxid sunt prezentate în fig. 9.37, săgețile indicând electronii și direcția spinului. Superoxidismutaza catalizează reacția a două molecule de ion superoxid cu doi protoni pentru a forma o moleculă de O_2 și una de H_2O_2.

GLUTATIONUL ȘI TOXICITATEA OXIGENULUI

Tripeptida glutation, a cărei structură este prezentată în fig. 9.38. se găsește în toate celulele mamiferelor, cu excepția neuronilor, și în multe tipuri de celule provenind de la alte specii decât mamiferele. El se caracterizează prin legătura γ-peptidică, care nu este atacată de către peptidaze dar este un substrat pentru γ-glutamiltransferază (a se vedea p. 80). Gruparea funcțională tiolică este principala responsabilă pentru proprietățile glutationului, care de aceea este abreviat ca GSH în forma redusă. Forma oxidată a două astfel de molecule este abreviată GSSG. În una dintre cele mai importante reacții la care participă glutationul, catalizată de către glutation-peroxidază, sunt inactivate peroxidul de hidrogen și alți peroxizi.

$2GSH + H_2O_2$ (sau RO_2H) → $GSSG + 2H_2O$ (sau $ROH + H_2O$)

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARĂ

GSSG este apoi redus din nou la GSH cu NADPH de către o enzimă numită glutationreductază. In hematii acest NADPH este furnizat de către ciclul pentozo fosfaților. Glutationul este important în mod special în mitocondrii, deoarece el reacționează (cu) și neutralizează speciile reactive de oxigen formate în mitocondrii. Deficiența experimentală de glutation, cauzată de administrarea unor inhibitori ai biosintezei glutationului, duce la moartea șobolanilor nou-născuți în circa 4-6 zile. La animale adulte au loc creșteri ale volumului mitocondriilor și apare cataracta. Are loc și o scădere accentuată a nivelului ascorbatului în timp ce administrarea ascorbatului în dietă ameliorează simptomele deficienței de glutation. Ascorbatul reacționează și el cu peroxidul de hidrogen și radicalii liberi ai oxigenului iar dehidroascorbatul care rezultă este redus din nou la ascorbat prin reacția cu glutationul. Aceste interdependențe sunt rezumate în fig. 9.39. În această figură, (O) reprezintă peroxizii și radicalii liberi ai oxigenului. Atât ascorbatul cât și dehidroascorbatul pot forma radical ascorbil, semidehidroascorbat, care poate fi reconvertit în ascorbat de către un sistem reductazic dependent de NADH.
Glutationul este sintetizat printr-un proces enzimatic specific în citosolul celulelor nucleate, și transportat în mitocondrii printr-un transportor din membrana internă (fig. 9.40).

DIFERENȚE ÎN FUNCȚIA MITOCONDRIALĂ A ȚESUTURILOR

Fig. 9.41 ilustrează modul în care fluxul metaboliților variază în mitocondriile diferitelor țesuturi în diferite situații.

- Situația (a): ficatul în timpul repausului alimentar. În timpul repausului alimentar, o mare cantitate de acizi grași și de oxalilacetat intră în ficat, acizii grași fiind convertiți în corpi cetonici iar oxalilacetatul acționând ca precursor în gluconeogeneză (vezi Capitolul 10).
- Situația (b): ficatul după o masă. În această situație, una dintre principalele funcții ale ficatului este de a duce la bun sfârșit lipogeneza pornind de la glucoza ingerată. Glucoza este degradată la acetil CoA care este exportată din mitocondrie ca citrat (p. 146)
- Situația (c): țesutul adipos brun. Acest țesut are un rol special în termoreglare. Oxidarea rapidă care nu conduce la lucru mecanic sau alte forme folositoare de energie, conduce la producere de căldură. Dacă există anumite metode de a înlătura controlul respirator, ca de exemplu prin hidroliza constantă a ATP, efectul va fi similar cu decuplarea fosforilării oxidative. Va exista un flux nerestricționat de electroni și oxidare a NADH, și o rată ridicată a metabolismului oxidativ care generează căldură. În țesutul adipos brun acesta se produce datorită prezenței unei proteine decuplante.
- Situația (d): mușchiul cardiac. În mușchiul cardiac, contracția constantă utilizează ATP convertindu-l la ADP. Există un număr mare de mitocondrii în mușchiul inimii garantând că oxidarea în inimă este întotdeauna aerobă (spre deosebire de metabolismul anaerob din mușchiul scheletic în anumite condiții p. 123).

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY

Metabolismul glucidelor și al lipidelor în repausul alimentar

10

Deşi multe ţesuturi pot utiliza diferite surse de energie, sistemul nervos şi hematiile sunt aproape în întregime dependente de glucoză şi, din această cauză, menţinerea constantă a nivelului concentraţiei glucozei în sânge este vital atunci când un animal este privat de alimente. Ficatul joacă un rol major, eliberând rapid glucoza din rezerva sa de glicogen (glicogenoliză) şi convertind aminoacizii, lactatul şi glicerolul, eliberaţi de către alte ţesuturi, în glucoză (gluconeogeneză). Deşi rezervele de glicogen din muşchi sunt mari, ele pot fi utilizate numai în muşchi şi nu contribuie direct la glucoza sanguină. Economisirea glucozei se realizează în multe ţesuturi prin trecerea la utilizarea unor surse alternative de energie, de exemplu muşchiul poate utiliza corpii cetonici eliberaţi din oxidarea lipidelor. Controlul acestor procese şi rolul insulinei în starea de sănătate şi boală, sunt discutate în cele ce urmează.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

METABOLISMUL ÎN REPAUSUL ALIMENTAR

CERINȚE METABOLICE ÎN REPAUSUL ANIMAL

Când unui animal nu i se dau alimente, este absolut necesar să i se asigure o aprovizionare cu glucoză a sângelui deoarece o scădere a glucozei sub nivelul critic (în jur de 2.5 mM la om) duce la disfuncții ale sistemului nervos central. La om acestea se manifestă ca simptome ale hipoglicemiei, cum sunt: slăbiciune musculară și necoordonare, confuzie mentală și transpirație. Dacă nivelul glucozei scade în continuare, se instalează coma hipoglicemică.

Sursa imediată de glucoză sanguină este rezerva de glicogen din ficat. Acesta poate fi scindat pentru a elibera glucoză în sânge în câteva secunde, proces numit glicogenoliză. Glicogenul muscular constituie o rezervă mai mare de glucoză, dar, așa cum va fi explicat mai târziu (p. 136), el nu contribuie direct la glucoza sanguină. Deși glicogenul este sursa imediată a producerii glucozei în ficat, ficatul poate rapid schimba sensul procesului producând glucoza prin sinteză de novo, din aminoacizi eliberați din mușchi și metabolizați în ficat – proces numit gluconeogeneză. În același timp începe cetogeneza. În ficat, prin acest proces, acizii grași eliberați din țesutul adipos sunt convertiți în corpi cetonici care pot fi utilizați în anumite țesuturi pentru a împiedica utilizarea excesivă a glucozei. Eliberarea acizilor grași din lipidele de rezervă, triacilgliceroli, poartă numele de lipoliză. Aceste procese sunt rezumate în fig. 10.1. Inițierea acestor procese este dependentă de secreția anumitor hormoni, așa cum se va discuta ulterior (Capitolul 13). Adrenalina și glucagonul activează enzimele care eliberează glucoza din glicogenul hepatic. Glucagonul activează deasemenea procesul de gluconeogeneză. Glucocorticoizii activează eliberarea de aminoacizi din mușchi iar adrenalina, hormonul adrenocorticotrop (ACTH) și hormonul somatotrop activează lipoliza.

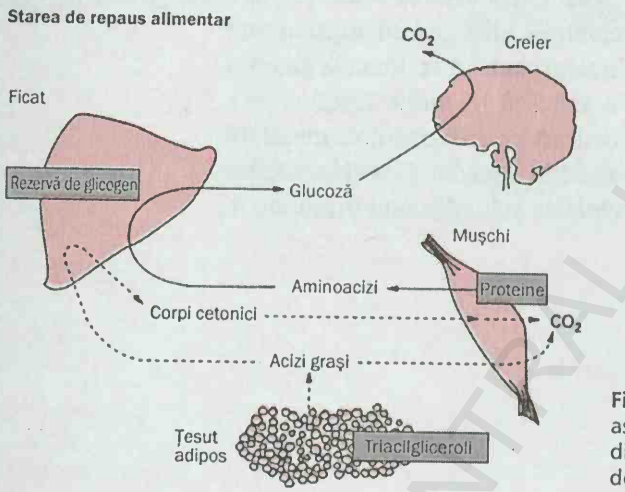


Fig. 10.1. Privire generală asupra interacțiunilor dintre țesuturi în starea de repaus alimentar.

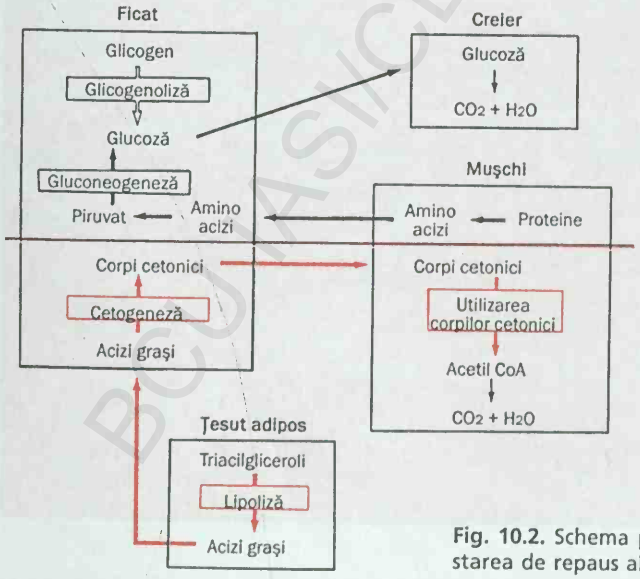


Fig. 10.2. Schema proceselor din starea de repaus alimentar.

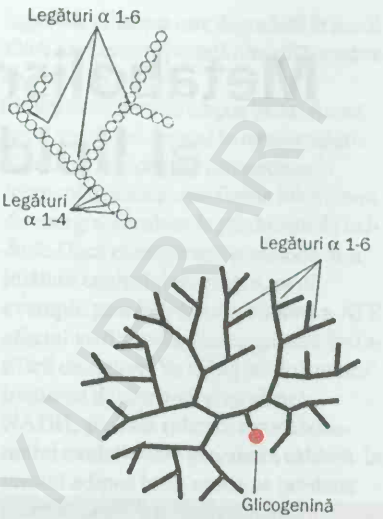


Fig. 10.3. Structura ramificată a glicogenului.

GLICOGENUL ȘI DEGRADAREA SA

STRUCTURA GLICOGENULUI

Catena principală a glicogenului constă în resturi de glucoză legate α1-4 glicozidic, cu ramificații formate prin legături α1-6 glicozidice la aproximativ tot al șaselea sau al șaptelea rest de glucoză, ceea ce determină o structură ramificată, așa cum este prezentată în fig. 10.3. Fig. 10.4 prezintă în detaliu legăturile α1-4 și α1-6 din molecula de glicogen.

GLICOGENOLIZA

Pentru o degradare eficientă a glicogenului ambele legături glicozidice, α1-4 și α1-6, trebuie să fie hidrolizate, dar primele atacate sunt legăturile α1-4. Enzima responsabilă pentru scindare, fosforilaza, îndepărtează resturile terminale de glucoză unul câte unul prin fosforoliză, o reacție analoagă cu hidroliza dar in care gruparea care atacă legătura este fosfatul și nu apa (fig. 10.5) Produsul reacției este glucozo-1-fosfatul. Degradarea glicogenului la glucoză implică patru reacții catalizate de patru enzime:

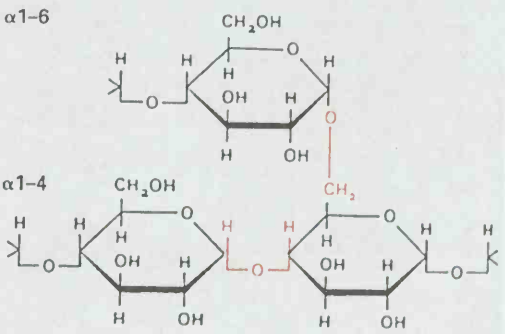


Fig. 10.4. Legăturile glicozidice α1-4 și α1-6 din glicogen.

BCU TASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

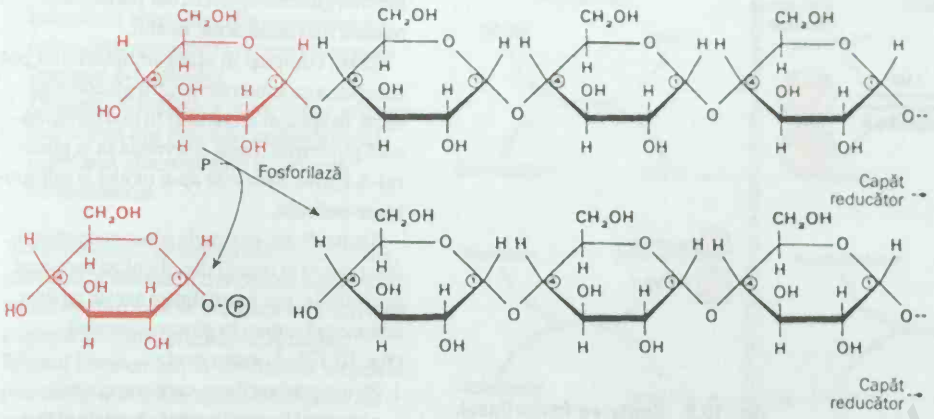


Fig. 10.5. Acțiunea fosforilazei.

1. Fosforilaza, care hidrolizează legăturile α1-4;
2. O etapă de deramificare, care îndepărtează ramificațiile cu legături α1-6;
3. Fosfoglucomutaza, care convertește glucozo-1-fosfatul în glucozo-6-fosfat;
4. Glucozo-6-fosfataza, care convertește glucozo-6-fosfatul în glucoză.

Acțiunea fosforilazei se derulează de-a lungul catenei până în apropierea unui punct de ramificare. La circa trei resturi de punctul de ramificare activitatea sa încetează și o enzimă de deramificare a glicogenului hidrolizează legăturile α1-6. Această enzimă are două activități asociate cu o singură catenă polipeptidică: o activitate de transferază care transferă toate resturile de glucoză, cu excepția unuia, de pe catena ce urmează a fi degradată pe capătul unei catene mai lungi, și, o activitate de 1,6-glucozidază care hidrolizează legătura α1-6, reacție în care se eliberează glucoză liberă (fig. 10.6). Degradarea glicogenului la glucoză necesită apoi conversia glucozo-1-fosfatului, eliberat de către fosforilază, la glucozo-6-fosfat și conversia acestuia la glucoză, de către glucozo-6-fosfatază. Efectul combinat al tuturor acestor enzime este ilustrat în fig. 10.7.
Glucozo-6-fosfataza nu este prezentă în mușchi, de aceea glicogenul muscular nu poate funcționa direct ca sursă de glucoză sanguină. În schimb acesta furnizează o sursă de energie pentru contracția musculară, glucozo-6-fosfatul fiind transformat de către enzimele glicolizei (dar a se vedea mai jos ciclul Cori).

REGLAREA FOSFORILAZEI

AMP ciclic a fost descoperit prima dată în timpul investigațiilor asupra mecanismului prin care se activează fosforilaza. S-a descoperit că o moleculă termostabilă din extracte celulare a fost responsabilă pentru creșterea activității fosforilazei din țesuturi stimulate cu adrenalină; această moleculă a fost identificată ca fiind AMP ciclic. Acesta activează o proteinkinază AMP-dependentă care apoi activează glicogenfosforilazkinaza, care la rândul ei fosforilează și activează fosforilaza (fig. 10.8), transformând-o din glicogenfosforilază *b* (Gp*b*) în glicogenfosforilază *a* (Gp*a*), care este forma mai activă.

Glicogenfosforilaza este un homodimer cu subunități de 97,4 kDa și cu piridoxalfosfat legat la Lys-680. Ea se conformează în general modelului Monod-Changeux-Wyman pentru enzime alosterice (p. 86). Atât forma fosforilată cât și cea nefosforilată a stării T trec în forma R activă, dar în timp ce pentru forma fosforilată aceasta se petrece spontan, pentru forma nefosforilată este nevoie de efectori (modifiers) alosterici cum ar fi glucozo-6-fosfatul. AMP se opune acestei acțiuni.

Fosfataza 1 (p. 163) îndepărtează restul fosfat din fosforilază.

Fosforilazkinaza activează fosforilaza prin fosforilarea ei la Ser-14, în regiunea N-terminală, așa cum se arată în fig. 6.35. Mecanismul prin care sunt reglate diferite forme ale fosforilazei este prezentat în fig. 10.9.

CICLUL CORI

Lipsa glucozo-6-fosfatazei în mușchi împiedică formarea glucozei libere în acest țesut. Totuși, metabolismul țesutului muscular poate contribui la glucoza

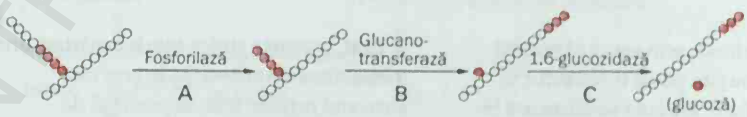


Fig. 10.6. Activitatea „enzimei de deramificare" este realizată de către glucanotransferază (B) și 1,6-glucozidază (C).

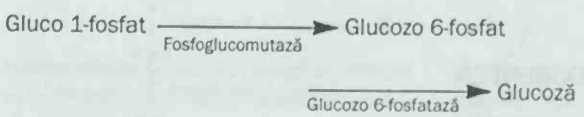


Fig. 10.7. Glucozo-1-fosfatul este convertit în glucoză prin intermediul glucozo-6-fosfat.

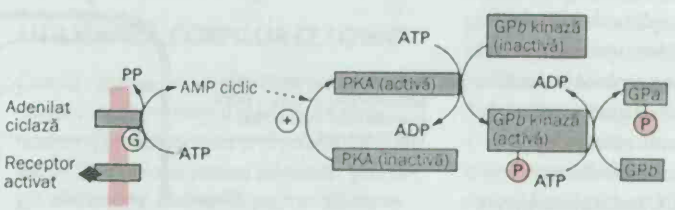


Fig. 10.8. Mecanismul activării fosforilazei de către AMP ciclic.

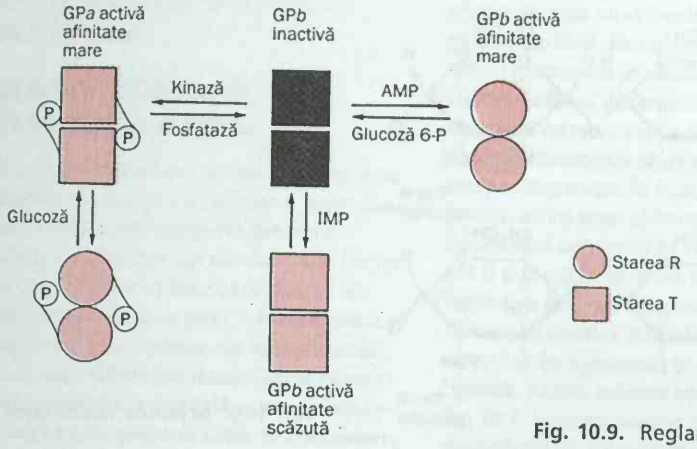


Fig. 10.9. Reglarea fosforilazei.

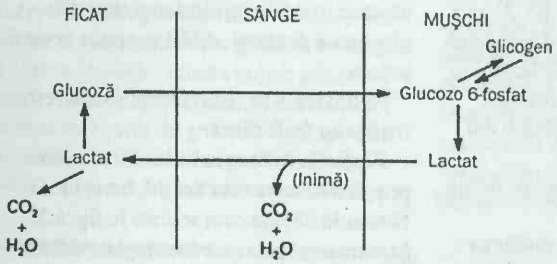


Fig. 10.10. Ciclul Cori.

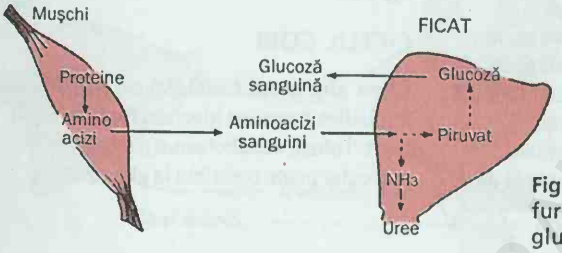


Fig. 10.11. Aminoacizii din muşchi furnizează carbon pentru gluconeogeneză.

sanguină indirect, prin aceea că lactatul produs în muşchi poate fi convertit în glucoză în ficat, aşa cum se ilustrează în fig. 10.10. Această secvenţă de reacţii a fost denumită ciclul Cori, după numele cuplului, soţ şi soţie, care au realizat pentru prima dată importanţa lui.

GLUCONEOGENEZA

PROCESUL DE GLUCONEOGENEZĂ

În timpul repausului alimentar, aprovizionarea cu glucoză a sângelui este dependentă de sinteza de novo din ficat, care utilizează scheletul de atomi de carbon al aminoacizilor proveniţi din muşchi (fig. 10.11); acest proces este cunoscut sub numele de gluconeogeneză. Scindarea proteinelor în muşchi, pentru a elibera aminoacizi este activată de către hormonii glucocorticoizi. Muşchiul, într-o anumită măsură, ajută ficatul prin conversia multor dintre aminoacizi în alanină. Când aceasta ajunge în ficat, gruparea amino este îndepărtată prin transaminare şi convertită în uree iar piruvatul rezultat intră în procesul de gluconeogeneză. Rinichiul şi intestinul subţire au de asemenea capacitatea de a efectua gluconeogeneza dar participă în măsură mai mică decât ficatul.

Şi alţi compuşi în afara aminoacizilor pot funcţiona ca substrate pentru gluconeogeneză, în special lactatul şi în mai mică măsură glicerolul, după conversia sa la glicerol-3-fosfat, care este apoi oxidat la dihidroxiacetonfosfat.

Multe dintre enzimele gluconeogenezei catalizează şi reacţii din glicoliză care sunt reversibile, dar patru dintre aceste enzime acţionează numai în gluconeogeneză (fig. 10.12). Acestea sunt:

1. Piruvatcarboxilaza, care converteşte piruvatul la oxalilacetat. Aceasta este o enzimă mitocondrială a cărei funcţie este de a furniza oxalilacetat pentru gluconeogenză, şi deasemenea pentru alte procese, cum ar fi pentru ciclul acidului citric.
2. Fosfoenolpiruvatcarboxikinaza (PEPCK), care converteşte oxalilacetatul la fosfoenolpiruvat. Cerinţa pentru GTP ca unul dintre substrate, cu GDP ca produs, asigură ca la concentraţia din celulă, să existe o diferenţă de energie liberă negativă între reactanţi şi produşi, deci formarea de către această enzimă a fosfoenolpiruvatului ca produs este favorizată întotdeauna. Există două forme ale acestei enzime: mitocondrială şi citosolică; la om se crede că reacţia decurge în citosol. În acest caz, oxalilacetatul este transportat afară din mitocondrie fie ca malat, după reducerea de către malatdehidrogenază, fie ca aspartat, după transaminare.Malatul şi aspartatul sunt reconvertite în oxalilacetat de către forme corespunzătoare ale enzimelor similare din citosol (Vezi fig. 10.13). Dacă PEPCK este mitocondrială, fosfoenolpiruvatul este transportat în citosol de către un transportor specific.

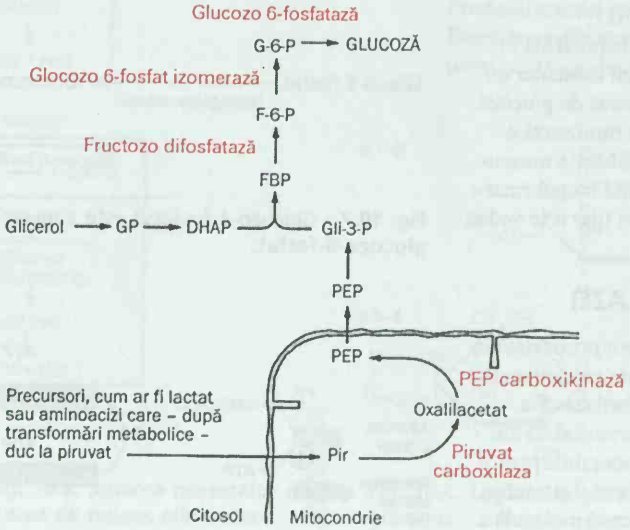


Fig. 10.12. Schema reacţiilor din gluconeogeneză.

3. Fructozodifosfataza, care este o enzimă hidrolitică citosolică; din considerente termodinamice este favorizată formarea fructozo-6-fosfatului.
4. Glucozo-6-fosfataza, care este o enzimă hidrolitică din reticulul endoplasmatic. Formarea glucozei este favorizată termodinamic.

Aceste enzime, şi corespondentele lor din glicoliză, participă în trei cicluri metabolice cu substraturi care se crede că sunt active în reglarea glicolizei şi gluconeogenezei. Efectul hormonilor, al efectorilor alosterici precum şi alte mecanisme de reglare ale acestor enzime şi ale celor implicate în biosinteza şi degradarea glicogenului, vor fi discutate într-o secţiune ulterioară (vezi Capitolul 13).

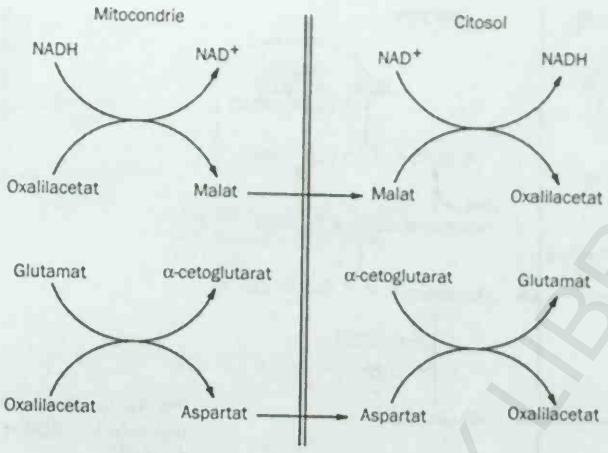


Fig. 10.13. Mecanismul transportului oxalilacetatului din mitocondrie în citosol.

FORMAREA ŞI UTILIZAREA CORPILOR CETONICI

CETOGENEZA

Gluconeogeneza este de obicei acompaniată de cetogeneză. Aproape toţi acizii graşi din ţesuturile corpului au un număr par de atomi de carbon şi duc prin degradarea lor la formarea de acetil CoA. De aceea ei nu pot contribui la sinteza netă de glucoză. În general ei nu sunt utilizaţi ca şi combustibil de către creier. Corpii cetonici, sintetizaţi din acizii graşi în timpul repausului alimentar, pot fi utilizaţi de către multe ţesuturi ca şi combustibil, în acest fel economisindu-se glucoza. În timpul unui repaus alimentar prelungit, chiar şi creierul se adaptează la utilizarea corpilor cetonici. O schemă a interacţiunilor între ţesuturi este prezentată în fig. 10.14. Corpii cetonici sunt sintetizaţi în ficat, care nu îi utilizează el însuşi. Structura celor trei compuşi cunoscuţi ca şi corpi cetonici – acetilacetat, 3-hidroxibutirat şi acetonă – împreună cu detalii ale procesului prin care ei se formează sunt redate în fig. 10.15. Schema arată că sunt necesare trei molecule de acetil CoA pentru a forma hidroximetilglutaril CoA (HMG CoA), una dintre acestea fiind eliberată din nou la conversia acestuia în acetilacetat.

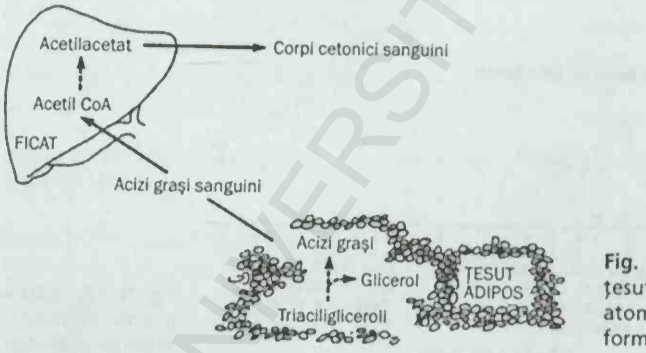


Fig. 10.14. Acizii graşi din ţesutul adipos furnizează atomi de carbon pentru formarea corpilor cetonici.

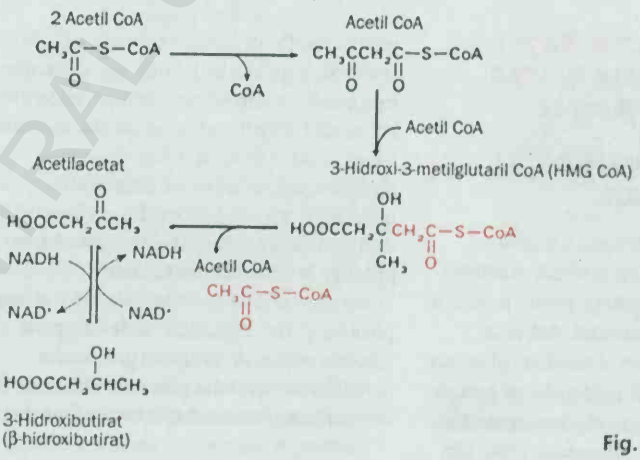


Fig. 10.15. Cetogeneza.

3-Hidroxibutiratdehidrogenaza este o enzimă mitocondrială care menţine echilibrul dintre 3-hidroxibutirat şi acetilacetat iar concentraţia relativă în sânge a acestor doi compuşi este reflectarea directă a statusului redox al mitocondriilor hepatice. O anumită parte a acetilacetatului se descompune spontan în acetonă. Metodele de laborator clinic măsoară în mod normal numai acetilacetatul; de aceea variaţia cantităţilor relative de acetilacetat şi hidroxibutirat care au loc cu variaţii în statusul redox al mitocondriilor hepatice afectează acurateţea măsurătorilor care indică cantitatea totală de corpi cetonici.

HMG CoA este deasemenea un intermediar în sinteza colesterolului (p. 155), dar în acest caz el este sintetizat de către o enzimă diferită, citosolică.

UTILIZAREA CORPILOR CETONICI

Corpii cetonici produşi în ficat circulă prin sânge şi sunt preluaţi şi utilizaţi de către ţesuturi periferice cum ar fi ţesutul muscular. În timpul unui repaus alimentar prelungit, creierul se adaptează pentru utilizarea corpilor cetonici. Fig. 10.16 prezintă reacţiile implicate. Multe dintre aceste reacţii sunt legate de procesele discutate anterior. Reacţia care nu a fost descrisă anterior este aceea între acetilacetat şi succinil CoA, un intermediar al acidului citric. În această reacţie se formează acetil-acetil CoA şi succinat. Succinatul poate fi metabolizat ulterior prin ciclul acidului citric, iar asupra acetil-acetil CoA acţionează o tiolază care duce la formarea a două molecule de acetil CoA, care în prezenţa unor cantităţi catalitice de oxalilacetat va fi apoi metabolizată prin ciclul acidului citric.

BIOCHEMICAL UNIVERSITY LIBRARY

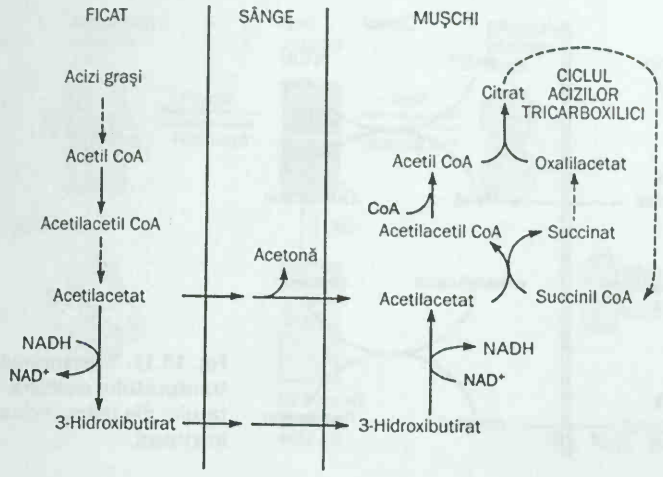


Fig. 10.16. Calea de utilizare a corpilor cetonici.

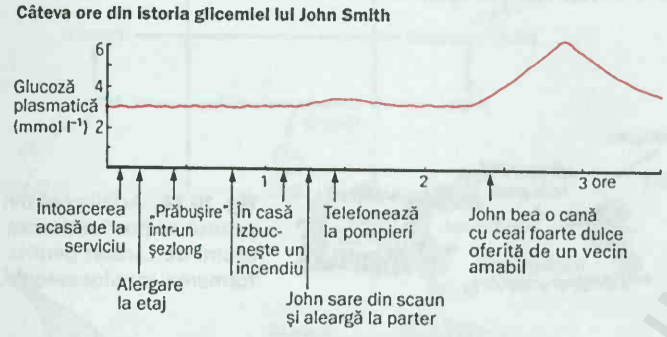


Fig. 10.17. Câteva ore din istoria variaţiei glicemiei lui John Smith.

CONTROLUL CONCENTRAŢIEI GLUCOZEI SANGUINE ÎN STĂRI NORMALE ŞI PATOLOGICE

CONTROLUL CONCENTRAŢIEI GLUCOZEI ÎN SÂNGE

În timpul repausului alimentar, ficatul reglează cu mare precizie şi viteză cantitatea de glucoză secretată în sânge pentru a suplini cantitatea ce a fost consumată. Astfel se asigură un nivel constant al nivelului glucozei în timpul repausului alimentar. Acest proces este ilustrat în situaţia ipotetică prezentată în fig. 10.17. O persoană înfometată poate sări brusc de pe un scaun şi fugi rapid doar cu un efect minor asupra nivelului glucozei din sânge datorită vitezei cu care ficatul măreşte eliberarea de glucoză. Aceasta este în contrast cu situaţia când glucoza este preluată din intestin. În acest ultim caz, se produce o creştere a concentraţiei glucozei în sânge, a cărei reducere este dependentă de secreţia de insulină.

DEREGLĂRI ALE CONCENTRAŢIEI GLUCOZEI ÎN SÂNGE

Datorită constanţei nivelului sanguin al glucozei la indivizi sănătoşi, în stare de repaus alimentar, orice concentraţie care se găseşte în afara valorilor normale indică o stare patologică. Nivelul ridicat al glicemiei este cunoscut sub numele de hiperglicemie iar nivelul scăzut, ca hipoglicemie. Aşa cum s-a explicat la începutul acestui capitol, hipoglicemia excesivă are consecinţe imediate şi severe. Efectele hiperglicemiei sunt mai de lungă durată. Starea în care se produce în cele mai multe cazuri hipoglicemia este diabetul zaharat, dar sunt posibile şi alte explicaţii. Un test frecvent efectuat pentru investigarea posibilelor dereglări ale nivelului glicemiei este testul de toleranţă la glucoză. Acest test se face după un repaus alimentar de o noapte. O cantitate de 75 g glucoză este administrată oral şi ulterior sunt luate probe de sânge la anumite intervale de timp. Se măsoară în probe concentraţia glucozei şi, uneori şi a altor substanţe. În exemplul din Fig. 10.18, sunt prezentate deasemenea şi concentraţiile insulinei şi acizilor graşi liberi. La un individ tânăr şi sănătos, concentraţia glucozei va scădea la nivelul normal după 1,5 ore. Un nivel ridicat al glicemiei la 2 ore indică, în mod normal, o stare diabetică.

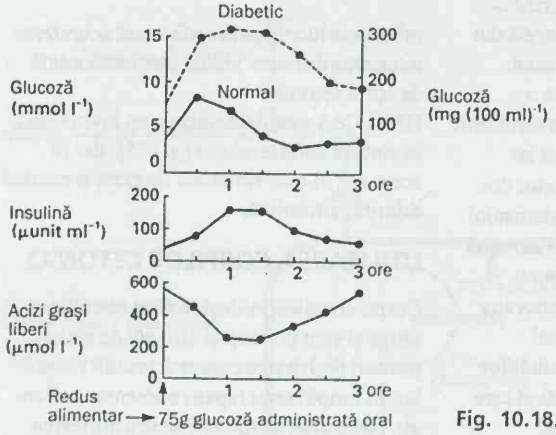


Fig. 10.18. Testul toleranţei la glucoză.

TIPURI DE DIABET ZAHARAT

Se cunosc două forme de diabet zaharat:

- Tipul 1, aşa numitul tip juvenil, deoarece se manifestă frecvent la copii şi adulţi tineri;
- Tipul 2, sau tipul matur, deoarece se manifestă frecvent pentru prima dată la adulţi maturi, în special dacă sunt obezi.

Deosebirea între cele două tipuri este întrucâtva neclară în anumite stadii ale bolii. Mai mult, se cunoaşte un tip de diabet matur la tineri (MODY- Maturity-Onset Diabetes of the Young), acesta fiind o variantă caracterizată de un tip de ereditate autozomal-dominantă.

În tipul 1 de diabet există o scădere importantă a eliberării insulinei de către celulele β ale insulelor Langerhans din pancreas. Singurul tratament eficient este administrarea de insulină; de aceea acest tip de diabet este deseori denumit ca diabet zaharat insulino-dependent (IDDM - Insulin Dependent Diabetes Mellitus). Se consideră că tipul 1 de diabet apare la mulţi pacienţi ca rezultat al unui atac autoimun al celulelor β de către anticorpi tisulari formaţi de către propriul sistem imun al pacientului.

În tipul 2 de diabet pot fi secretate cantităţi semnificative de insulină. Motivele pentru care nu se reuşeşte menţinerea unei glicemii normale, în condiţiile unei secreţii de insulină, nu sunt încă bine înţelese.

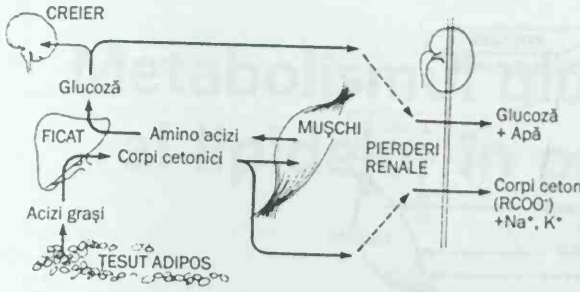


Fig. 10.19. Consecinţele deficienţei severe de insulină.

Totuşi într-un număr de cazuri este implicată incapacitatea genetică a celulelor ţintă de a răspunde semnalului insulinei. În formele uşoare de diabet de tip 2, tratamentul constă în recomandări referitoare la dietă şi în utilizarea unor medicamente care să stimuleze eliberarea insulinei de către pancreas. De aceea acest tip de diabet este cunoscut ca diabetul zaharat non-insulinodependent (NIDDM-Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus). În cele din urmă, administrarea de insulină poate fi necesară şi în acest tip al bolii.

CONSECINŢELE DEFICIENŢEI SEVERE DE INSULINĂ

Criza clasică de diabet acut, cu scăderea nivelului sanguin al insulinei la valori critice, se caracterizează prin:

- glicemie ridicată;
- concentraţii foarte ridicate ale corpilor cetonici şi acizilor graşi liberi;
- pierderea de săruri;
- excreţie excesivă de uree, producere excesivă de urină (poliurie);
- deteriorare severă a ţesutului.

Aşa cum este ilustrat în fig. 10.19, această stare poate fi văzută ca un exemplu al metabolismului de repaus alimentar dus la extrem, iar originile sale pot fi înţelese din cunoaşterea acestei situaţii. În absenţa insulinei, nu există un regulator care să menţină între anumite limite activitatea unor hormoni ca: glucocorticoizii, glucagonul, ACTH şi hormonul somatotrop. Va exista astfel o concentraţie foarte mare a glucozei în sânge, rezultată din incapacitatea ţesuturilor de a prelua glucoza şi din eliberarea nefolositoare a aminoacizilor din proteinele musculare pentru a întreţine un răspuns gluconeogenetic inutil. Aceasta poate duce la pierderi musculare severe şi la excreţie excesivă de uree. Va avea loc o eliberare continuă de acizi graşi liberi din ţesutul adipos, ducând eventual la pierderea aproape completă a grăsimilor corpului, şi secreţia unor cantităţi mari de corpi cetonici din ficat. Glucoza este eliminată prin rinichi în cantitate mare, iar presiunea osmotică ridicată cauzată de aceasta duce la excreţia excesivă de apă de către rinichi. În acelaşi timp are loc şi excreţia corpilor cetonici acizi rezultaţi, care este însoţită de excreţia de săruri.

Unii dintre aceşti corpi cetonici sunt convertiţi în acetonă, care este expirată şi al cărei miros poate fi simţit în respiraţie. Un scriitor grec timpuriu descria diabetul ca „topirea trupului în apă". Mai corect ar putea fi descris ca „topirea" trupului în glucoză, uree şi corpi cetonici.

BOLILE DE STOCARE A GLICOGENULUI

Există câteva defecte genetice ce duc la stări în care se acumulează glicogenul. Acestea au consecinţe severe asupra sănătăţii ţesuturilor, în special a ficatului. Ele sunt cunoscute ca boli de stocare a glicogenului. Una dintre cele mai comune boli se datorează deficienţei glucozo-6-fosfatazei, şi este cunoscută ca tipul 1 de boală de stocare a glicogenului, sau boala von Gierke. Deoarece se cunoaşte cu precizie defectul metabolic, simptomele reprezintă un model în care pot fi studiate interconexiunile procesului cu metabolismul glucidic. Simptomele includ, după numai un scurt repaus alimentar, o hipoglicemie severă. Se observă deasemenea o cetoză uşoară şi o acidoză lactică uşoară. Schema prezentată în fig. 10.20 ilustrează câteva efecte ale deficienţei la nivel molecular.

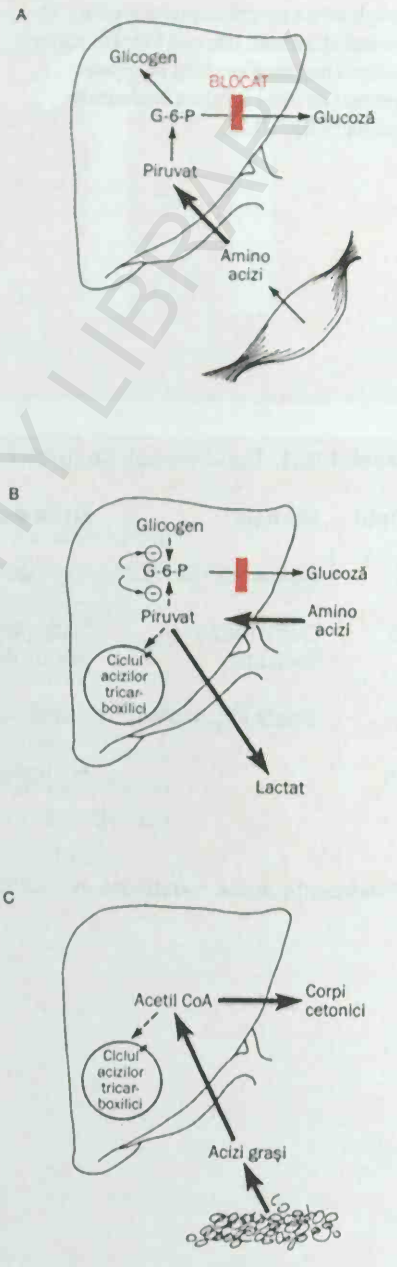


Fig. 10.20. Procese metabolice în deficienţa de glucozo-6-fosfatază.

- Fig. 10.20 A arată că, în repausul alimentar, mobilizarea aminoacizilor pentru a acţiona ca precursori pentru gluconeogeneză duce la formarea piruvatului în ficat, care mai departe duce la formarea glucozo-6-fosfatului. Deoarece glucozo-6-fosfatul nu poate fi exportat ca glucoză, mare parte din el va fi îndreptat spre formarea glicogenului. Hipoglicemia rezultată va exacerba această situaţie deoarece organismul tinde să corecteze această stare prin eliberarea unei cantităţi mai mari de aminoacizi.
- Fig. 10.20 B indică faptul că procesul feedback rezultat din acumularea glucozo-6-fosfatului va tinde să promoveze acumularea piruvatului, şi aceasta va duce la formarea lactatului care va fi eliberat în sânge.
- Fig. 10.20 C indică incapacitatea de a forma glucoza. Hipoglicemia severă care se produce, dacă nu se ingerează rapid glucoză, va duce la o eliberare exagerată a acizilor graşi din ţesutul adipos şi ca urmare, la instalarea cetozei.

Se cunosc câteva boli de stocare a glicogenului, câteva dintre acestea fiind rezumate în tabelul 10.1.

HIPERINSULINEMIA

Secreţia excesivă de insulină are loc în caz de insulinom, o tumoră a pancreasului.

Hipoglicemia severă se poate produce în repausul alimentar, datorită blocării parţiale a acţiunii hormonilor stării de repaus alimentar de către insulină, aşa cum se prezintă în fig. 10.21.

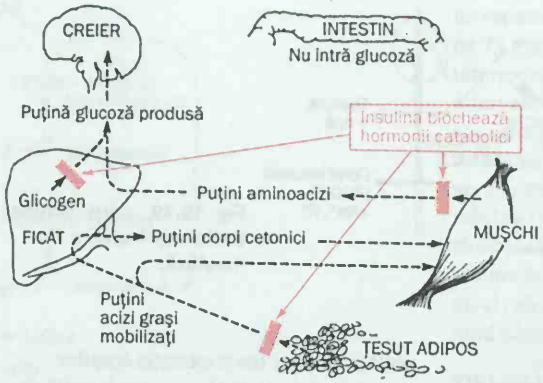


Fig. 10.21. Consecinţele hipersecreţiei de insulină.

Tabelul 10.1. Tipuri de boli de stocare a glicogenului

Tipul	Numele	Enzima afectată	Ţesutul	Observaţii
I	Boala Von Gierke	Glucozo-6-fosfataza	Ficat, rinichi	Nivel scăzut al glicemiei în timpul repausului alimentar, ficat mărit cu nivel ridicat al glicogenului
III	Dextrinoză limitată	Sistemul de deramificare*	Ficat sau muşchi	Fosforilaza acţionează asupra legăturilor α1-4 până când se ajunge la legătura α1-6. Molecula rezultată se numeşte dextrină limită
V	Boala Mc'Ardle	Fosforilaza	Muşchi	Dureri musculare, slăbiciune şi rigidizare chiar după exerciţii uşoare
VI		Fosforilaza	Ficat	Are câteva trăsături similare cu tipul I, dar gluconeogeneza nu este blocată şi hipoglicemia poate să nu fie atât de severă

* Deficienţa poate fi datorată activităţilor glucanotransferazei sau 1,6-glucozidazei, în ficat, muşchi sau în ambele organe

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Metabolismul glucidelor și al lipidelor în procese de absorbție

11

Alimentele ingerate în surplus față de nevoile imediate ale animalului sunt transformate în lipide și glicogen, ca rezerve de energie pentru utilizarea în perioadele de privare de alimente. Procesele operative în această stare metabolică sunt glicogenogeneza, adică biosinteza glicogenului din glucoză, și acele elemente ale lipogenezei care sunt implicate în biosinteza triacilgliceroliilor din acizi grași. În plus, trebuie sintetizate glucidele și lipidele cu rol structural. O diversitate de acizi grași sunt necesari în membrana celulară, inclusiv acizi grași polinesaturați de tip *n*-3 și *n*-6. Acizii grași precursori ai acestora trebuie asigurați prin aport alimentar și sunt cunoscuți sub numele de acizi grași esențiali.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

PROCESUL DE ABSORBȚIE

PRIVIRE GENERALĂ ASUPRA STĂRII ABSORBTIVE

Alimentele ingerate asigură animalului nevoile imediate de precursori pentru sintezele esențiale de compuși structurali și de substraturi oxidative. Totuși, nu este neobișnuit, în societatea industrială modernă, să fie consumate alimente în excedent față de nevoile organismului. În mod similar, la un animal în sălbăticie, o masă consumată după un repaus alimentar poate depăși nevoile imediate ale animalului. În ambele cazuri, alimentele ce sunt în surplus față de nevoile imediate vor fi convertite în compuși care pot fi stocați ca rezerve de energie pentru utilizarea lor într-o perioadă de privare alimentară. Două rezerve importante de energie sunt lipidele – sub formă de triacilgliceroli, și glicogenul.

Fig. 11.1 rezumă evenimentele ce se desfășoară în timpul stării absorbtive. Glucidele ingerate sunt scindate pe traiectul digestiv până la monoglucide, care sunt apoi absorbite în sânge. O componentă majoră este glucoza, care este preluată de către ficat și mușchi și care, dacă nu este oxidată la CO_2 și H_2O, este convertită în glicogen și triacilgliceroli. Lipidele ingerate sunt hidrolizate în intestin mai ales la acizi grași și monoacilglicerol (în cazul triacilglicerolilor), iar aceștia sunt utilizați la resintetizarea de triacilgliceroli și fosfolipide care sunt încorporați în lipoproteinele plasmatice. Triacilglicerolii din aceste lipoproteine sunt prelucrați și apoi descărcați în rezervele de lipide din țesutul adipos, așa cum se va descrie ulterior. În această stare metabolică este secretată insulina, un hormon ce exercită efecte majore asupra etapelor implicate în aceste procese.

DIGESTIA ALIMENTELOR

Înainte ca alimentele să fie absorbite din tractul digestiv, ele trebuie să fie prelucrate și convertite într-o formă adecvată absorbției.

Enzimele responsabile pentru acest proces sunt prezentate în fig. 11.2.

Glucidele sunt hidrolizate de către amilaze. Acest proces începe în cavitatea bucală, deoarece saliva conține cantități importante de amilază, și continuă în intestinul subțire. Proteinele sunt scindate de către enzime proteolitice, numite endopeptidaze, secretate în stomac (pepsina) și intestin (tripsina și chimotripsina). Lipidele sunt hidrolizate de către lipaze și fosfolipaze. Cu excepția amilazei salivare și a pepsinei, care este secretată de către celulele peretelui gastric, toate aceste enzime sunt secretate de către celulele pancreasului exocrin, în intestin, ca răspuns la hormonii care sunt secretați odată cu ingerarea alimentelor. Hidroliza lipidelor este facilitată de prezența sărurilor biliare care sunt secretate de către ficat în bilă.

DIGESTIA PROTEINELOR

Pepsina, tripsina și chimotripsina sunt enzime secretate sub formă de zimogeni ca: pepsinogen, tripsinogen și respectiv chimotripsinogen. Zimogenii sunt convertiți în enzimele active de către acidul clorhidric din stomac, în cazul pepsinei, și de către enterokinaze, în cazul tripsinei. Tripsina convertește chimotripsinogenul la enzima activă. Fiecare dintre aceste enzime prezintă specificitate față de legătura peptidică pe care o hidrolizează, așa cum se prezintă în fig. 11.3. Pepsina atacă legături peptidice dinspre gruparea carboxil a resturilor hidrofobe cum ar fi, fenilalanina, tirozina și leucina. Tripsina atacă legături dinspre gruparea carboxil a resturilor bazice iar chimotripsina – dinspre gruparea carboxil a resturilor aromatice. Două alte enzime, îndepărtează un singur rest, fie de la capătul N-terminal, în cazul leucinaminopeptidazei, fie de la capătul C-terminal, ca și carboxipeptidaza A. Ca rezultat, proteinele sunt degradate într-un amestec de peptide mici și aminoacizi care sunt apoi absorbiți.

DIGESTIA GLUCIDELOR

Există două tipuri de amilaze: α-amilaza și β-amilaza. Ambele tipuri scindează legături α1-4 glicozidice dar β-amilaza determină o inversare a legăturii în unitățile de maltoză care rezultă, deci produsul ei final este β-maltoza. β-Amilazele se găsesc mai ales în plante și bacterii și îndepărtează unitățile de maltoză de la capătul nereducător al substratului. Din această cauză ele poartă numele de exoamilaze. α-Amilazele din salivă și din sucul pancreatic scindează legăturile α1-4 interne, deci sunt endoamilaze. Ele hidrolizează amiloza și amilopectina – poliglucidele majore din plante – și glicogenul. Principalul produs al reacției de hidroliză este maltoza (fig. 11.4), dar se mai formează și o triglucidă – maltotrioza – care conține trei resturi de glucoză legate α1-4. α-Amilazele sunt enzime ce necesită prezența ionilor de Ca^{2+}. Ele inserează cinci resturi de glucoză, adiacente restului terminal reducător, în despicătura centrului activ („cleft") și scindează legătura între al doilea și al treilea rest de glucoză. Deoarece

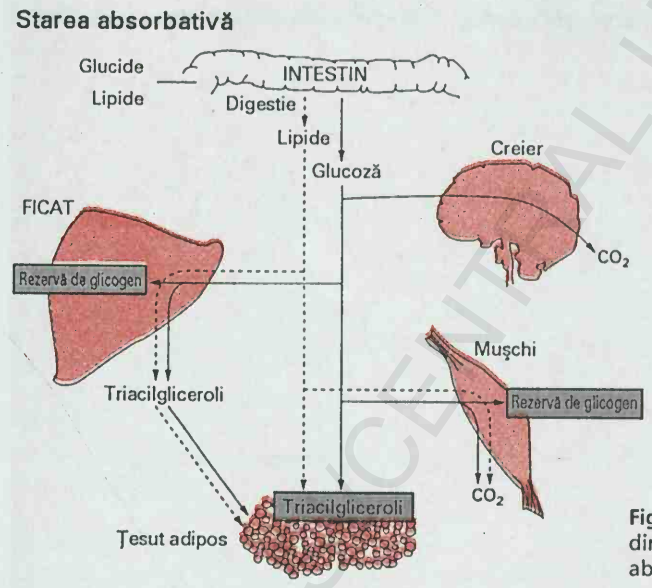


Fig. 11.1. Interacțiunile dintre țesuturi în starea absorbtivă.

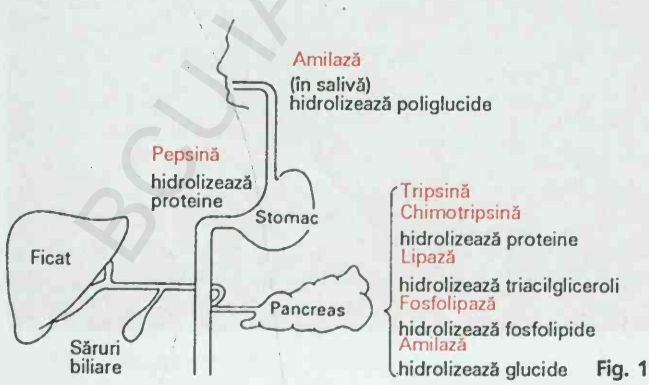


Fig. 11.2. Enzimele digestive.

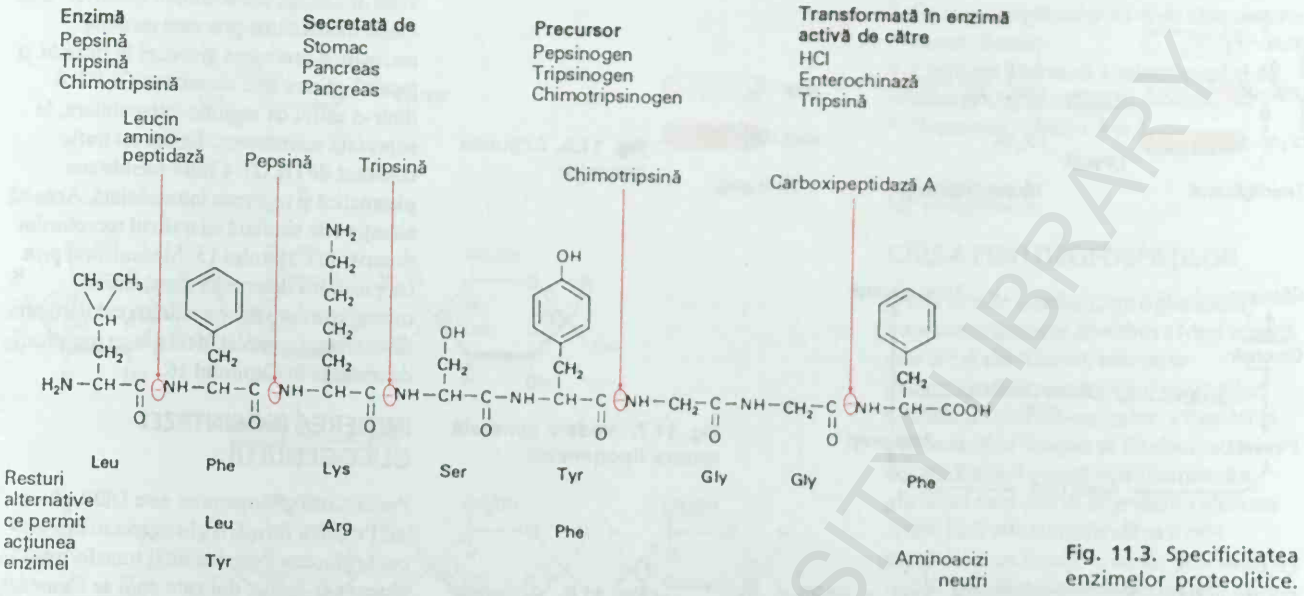


Fig. 11.3. Specificitatea enzimelor proteolitice.

α-amilazele nu scindează legăturile α1-6, produşii de hidroliză ai amilopectinei sunt oligoglucide numite dextrine limită. Enterocitul poate absorbi numai glucoză liberă, de aceea oligoglucidele sunt hidrolizate mai departe de către oligoglicozidaze din suprafaţa în perie a membranei intestinale. Printre acestea sunt incluse zaharaza, care hidrolizează zaharoza la glucoză şi fructoză, şi lactaza, care hidrolizează lactoza până la obţinerea în final a două molecule de glucoză. Deficienţa de diglicozidaze intestinale nu este neobişnuită la om. Deficienţa de lactază duce la intoleranţă la lactoză, când se produce meteorism şi diaree. Aceste manifestări se datorează faptului că lactoza nu este absorbită şi trece în intestinul subţire unde este fermentată de către bacteriile intestinale producând gaze. Prezenţa compuşilor osmotic activi determină atragerea apei în intestin, ceea ce produce diaree. Folosirea unui lapte prelucrat special, din care a fost îndepărtată lactoza, ameliorează simptomele.

DIGESTIA LIPIDELOR

Grăsimile ingerate constau într-o varietate de lipide din care majoritare sunt fosfolipidele şi triacilglicerolii. Circa 15 % din triacilgliceroli sunt hidrolizaţi în stomac de către o lipază secretată de către celulele secretoare gastrice. Ceea ce rămâne din triacilgliceroli şi fosfolipide, este hidrolizat în intestinul subţire de către enzime secretate de celulele acinare ale pancreasului. Acestea includ o fosfolipază şi o triacilglicerol lipază. Lipaza pancreatică acţionează asupra micelelor de triacilgliceroli şi săruri biliare (vezi pag. 157). Sărurile biliare acţionează asupra picăturilor mari de lipide pentru a le transforma în micele de mici dimensiuni. Lipaza este o proteină de 46 kDa care se inserează ea însăşi în interfaţa de pe suprafaţa micelelor, împreună cu colipaza, un cofactor proteic de 10 kDa care este esenţial pentru activitatea enzimatică (fig. 11.5). În fig. 11.5 este arătat precursorul colipazei, procolipaza (în roşu), deoarece acesta a fost utilizat în studiile experimentale. În imaginea A, în absenţa lipidelor, regiunea „capac" a lipazei („lid") acoperă centrul activ dar, în prezenţa lipidelor (imaginea B), capacul este retras spre procolipază.

Lipaza îndepărtează cei doi acizi graşi dinspre exterior, dând naştere la monoacilglicerol, aşa cum se arată în fig. 11.6. Acizii graşi şi monoacilglicerolul sunt transportaţi în celulele ce căptuşesc peretele intestinal. După absorbţie, acizii graşi sunt convertiţi în acid gras CoA prin reacţia redată la p. 146. Acid gras CoA poate apoi reacţiona cu monoacilglicerolul pentru a reforma triacilglicerol care este apoi încorporat în chilomicroni (vezi Capitolul 12). Triacilglicerolul se formează deasemenea şi în celulele intestinale, din glicerol-3-fosfat şi acid gras CoA, aşa cum a fost decris la p. 148.

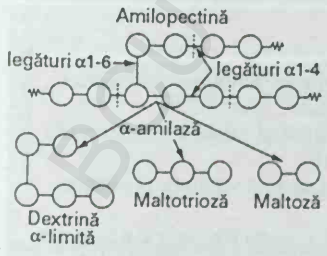


Fig. 11.4. Acţiunea amilazelor.

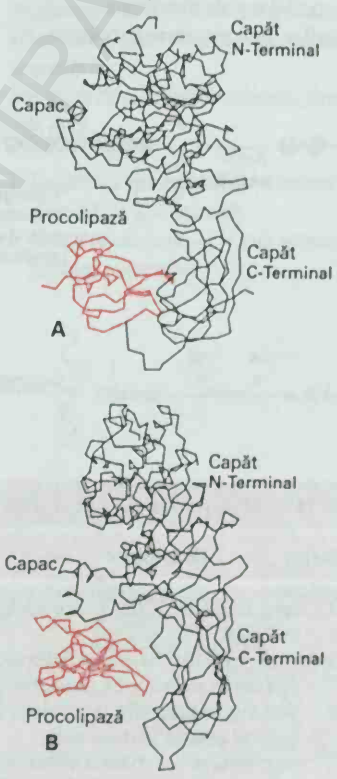


Fig. 11.5. Acţiunea colipazei.

GLUCOZA CA PRECURSOR ÎN GLICOGENOGENEZĂ ŞI LIPOGENEZA

Biosinteza glicogenului, cunoscută ca glicogenogeneză, se desfăşoară în ficat şi în muşchi, iar în starea absorbtivă, principalul precursor este glucoza sanguină. Lipogeneza are loc în ficat şi ţesutul adipos. Glucoza sanguină este un precursor important în procesul de lipogeneză din starea absorbtivă, dar biosinteza triacilglicerolilor poate avea loc şi prin reasamblarea acizilor graşi ingeraţi în

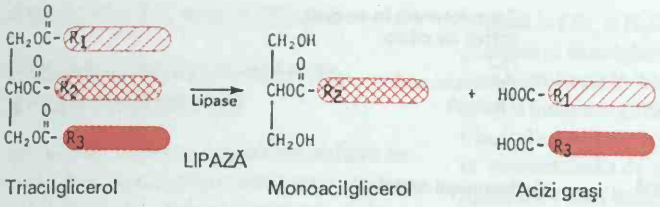


Fig. 11.6. Acţiunea lipazelor.

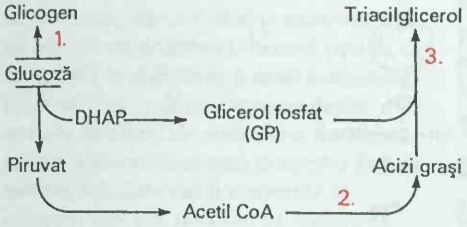


Fig. 11.7. Vedere generală asupra lipogenezei.

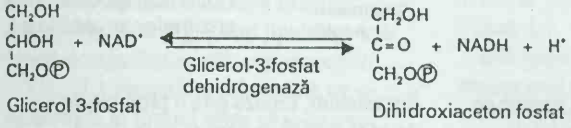


Fig. 11.8. Acţiunea glicerol-3-fosfat dehidrogenazei.

triacilgliceroli cu compoziţie diferită, mai adecvată stocării. Rezervele de triacilglicerol conţin mai ales acizi graşi saturaţi şi mononesaturaţi ce sunt utilizaţi ca substraturi pentru oxidare. Acizii graşi polinesaturaţi sunt stocaţi ca şi componenţi ai fosfolipidelor din membrane. Principalele căi implicate în conversia glucozei la glicogen şi triacilgliceroli sunt rezumate în fig. 11.7. Aceasta prezintă (cu numere roşii): (1) formarea glicogenului din glucoză; (2) sinteza acizilor graşi din acetil CoA; (3) sinteza triacilglicerolilor din acizi graşi (după conversia la acid gras CoA) şi glicerol-3-fosfat.

Biosinteza triacilglicerolilor necesită rezerve de glicerol-3-fosfat pentru realizarea scheletului de glicerol al moleculelor de lipide. Acesta se formează sub acţiunea glicerol-3-fosfat dehidrogenazei, care reduce dihidroxiacetonfosfatul – intermediar al glicolizei - folosind NADH (fig. 11.8).

GLICOGENOGENEZA

TRANSPORTORII GLUCOZEI

Una dintre cele mai importante etape în metabolismul glucozei este transportul ei prin membrana plasmatică. În ţesuturile ne-epiteliale, acest proces se realizează prin difuzie facilitată (vezi pag. 196), mediată de o familie de transportori de glucoză. Au fost identificate cinci familii de transportori ai glucozei denumite de la GLUT 1 până la GLUT 5. Distribuţia lor în ţesuturi este detaliată în tabelul 11.1. În plus mai există, GLUT 6 care este o presupusă genă dar care nu produce proteine, şi GLUT 7 care este un transportor intracelular în membrana reticulului endoplasmic din celulele hepatice.

Capacitatea totală a membranei plasmatice de a transporta glucoza în celulă depinde de cantitatea de transportori din membrană. Aceasta depinde nu numai de rata de sinteză dar şi de distribuţia transportorilor între membrană şi câteva zone de stocare intracelulare specifice. Una dintre modalităţile prin care insulina intensifică preluarea glucozei în muşchi şi ţesutul adipos este recrutarea GLUT 4 dintr-o astfel de regiune intracelulară, la suprafaţa membranei. Există un trafic constant de GLUT 4 între membrana plasmatică şi regiunea intracelulară. Această situaţie este similară cu traficul receptorilor descrişi în Capitolul 15. Mecanismul prin care insulina determină translocarea transportorilor spre membrana celulară este discutat mai complet în relaţie cu receptorii de insulină în Capitolul 16.

INIŢIEREA BIOSINTEZEI GLICOGENULUI

Precursorul glicogenului este UDP-glucoza. Pe calea formării glicogenului din glucoză, glucoza este mai întâi transformată în glucozo-6-fosfat, din care apoi se formează glucozo-1-fosfat. Glucozo-1-fosfatul reacţionează cu UTP pentru a forma UDP-glucoza. UDP-glucoza reacţionează apoi cu glicogenina, o proteină implicată în biosinteza glicogenului. Această proteină poate cataliza fixarea unei molecule de glucoză la unul dintre resturile proprii de tirozină, printr-o legătură între hidroxilul din C-1 al glucozei şi gruparea hidroxil fenolică a restului de tirozină. Produsul format poate cataliza fixarea la restul de glucoză a circa şapte alte molecule de glucoză prin legături α1-4 glicozidice. Primerul astfel format funcţionează ca substrat pentru glicogen sintetază (fig. 11.9). Fiecare moleculă de glicogenină poartă o moleculă de glicogen.

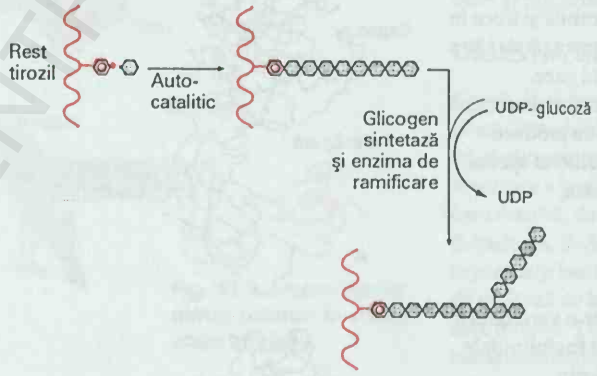


Fig. 11.9. Funcţionarea glicogeninei.

Tabelul 11.1. Clasificarea transportorilor de glucoză

Transportor	Distribuţie
GLUT 1	Larg răspândit, dar mai abundent în hematii şi sistemul microcirculator cerebral
GLUT 2	Ficat, membranele basolaterale ale enterocitului şi celule β din pancreas
GLUT 3	Aproape exclusiv în neuronii şi muşchi fetali
GLUT 4	Ţesuturile sensibile la insulină (de exemplu muşchiul scheletic şi cardiac, ţesutul adipos brun şi alb).
GLUT 5	Membrana luminală a enterocitului, spermă, muşchi scheletic şi adipocite. Este un transportor de fructoză, fie preferenţial, fie alături de rolul de transportor al glucozei

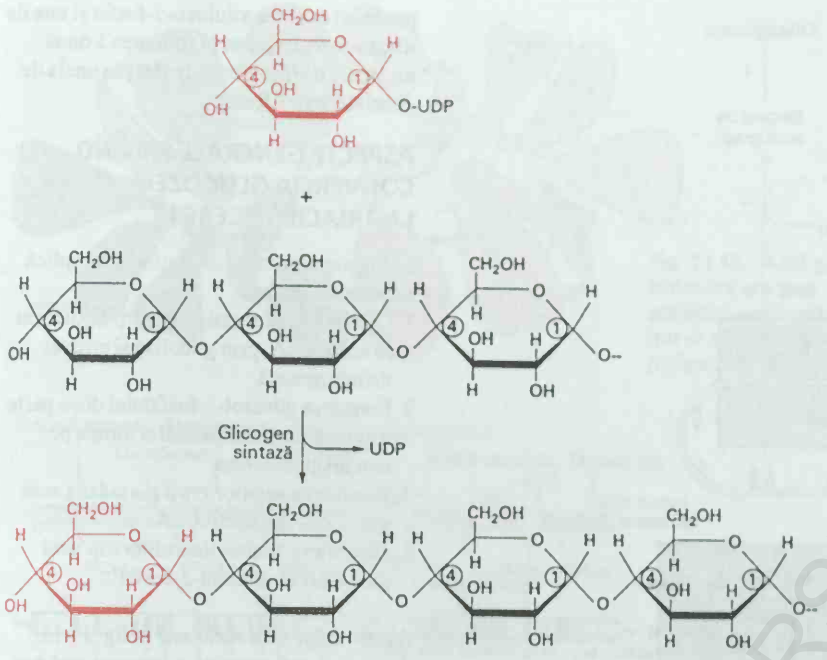


Fig. 11.10. α1-4 Glicogen sintaza adaugă resturi de glucoză prin legături α1-4 glicozidice.

GLICOGEN SINTAZA

Catenele principale de glicogen sunt sintetizate prin fixarea de unităţi de glucoză la C-4 al moleculei terminale de glucoză, la capătul nereducător al catenei primer α1-4 preexistente. A se observa că gruparea reducătoare de la C-1 a fiecărei unităţi de glucoză ce se fixează este implicată într-o legătură cu catena existentă. Funcţionarea glicogen sintetazei este schiţată în fig. 11.10. Enzima este supusă unui sistem de reglare fină, aşa cum este prezentat în Capitolul 13.

ENZIMA DE RAMIFICARE

Ramificaţiile din molecula de glicogen sunt introduse de către o enzimă cunoscută ca enzima de ramificare. Această enzimă scindează o catenă cu şase unităţi de glucoză de la capătul în creştere al catenei α1-4, şi transferă această hexaglucidă pe o altă catenă, prin formarea unei legături α1-6 glicozidice între hidroxilul de la C–1 al hexaglucidei şi hidroxilul de la C-6 a unui rest de glucoză din catena pe care se face transferul (fig. 11.11). Locul în care se face legarea este la o distanţa de circa şase resturi de glucoză faţă de legătura α1-6 precedentă. Acţiunea combinată a glicogeninei, glicogen sintetazei şi enzimei de ramificare, duce la formarea moleculei de glicogen. Trebuie apreciat faptul că în celulă, glicogenul este polidispers – adică el constă din molecule de glicogen de diferite dimensiuni, toate aflate în diferite stadii ale sintezei sau degradării.

Secvenţa de reacţii în biosinteza glicogenului este deci:

1. Legarea a aproximativ opt resturi de glucoză la glicogenină.
2. Creşterea catenei α1-4 sub acţiunea glicogen sintetazei
3. Formarea legăturilor α1-6 de către enzima de ramificare
4. Creşterea ulterioară a catenelor α1-4 de către glicogen sintetază.
5. Repetarea etapelor 3 şi 4.

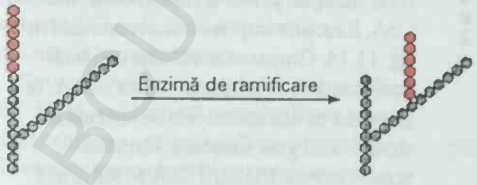


Fig. 11.11. Enzima de ramificare transferă o catenă α1-4 din şase resturi de glucoză formând o legătură α1-6.

LIPOGENEZA

CALEA PENTOZOFOSFAŢILOR

O altă cale de metabolizare a glucidelor, importantă în starea absorbtivă (deşi această cale are şi alte funcţii), este calea pentozofosfaţilor, sau şuntul pentozelor. Numele de şuntul pentozelor a fost dat în perioada când începea să fie elucidată, deoarece a fost văzută ca o alternativă a glicolizei ca şi cale de degradare a glucozei. Acum însă este considerată ca o cale metabolică cu funcţii speciale prin ea însăşi. Una dintre aceste funcţii este de a furniza pentoze pentru sinteza nucleotidelor şi acizilor nucleici. O altă funcţie este de a realiza reducerea $NADP^+$ la NADPH în vederea susţinerii procesele de biosinteză, cum ar fi biosinteza acizilor graşi, care necesită NADPH.

Calea pentozofosfaţilor se desfăşoară în citosol iar reacţiile sunt schiţate în fig. 11.12. NADPH este un produs a două dehidrogenaze, glucozo-6-fosfat dehidrogenaza şi 6-fosfogluconat dehidrogenaza, care transformă glucozo-6-fosfatul într-o pentoză, ribulozo-5-fosfat. Ribulozo-5-fosfatul suferă izomerizări la xilulozo-5-fosfat şi ribozo-5-fosfat, iar aceşti doi compuşi servesc ca şi substrate pentru transcetolază, pentru a forma sedoheptulozo-7-fosfat şi gliceraldehid-3-fosfatul. Transaldolaza converteşte apoi aceşti produşi la fructozo-6-fosfat şi eritrozo-4-fosfat. Transcetolaza mai catalizează şi reacţia între xilulozo-5-fosfat şi eritrozo-4-fosfat, prin care se formează gliceraldehid-3-fosfatul şi fructozo-6-fosfatul. Astfel trei molecule de

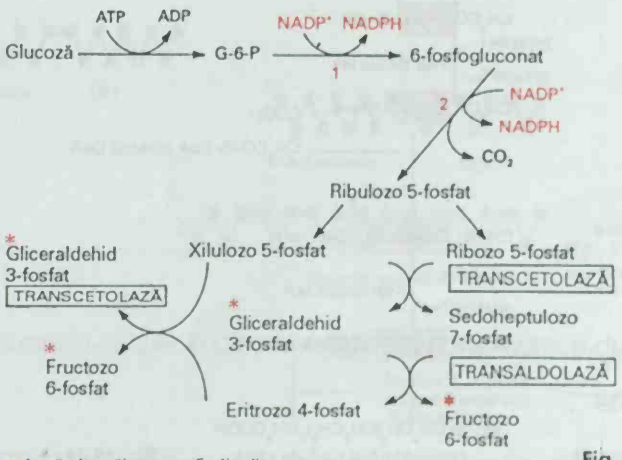


Fig. 11.12. Calea pentozo fosfaţilor.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

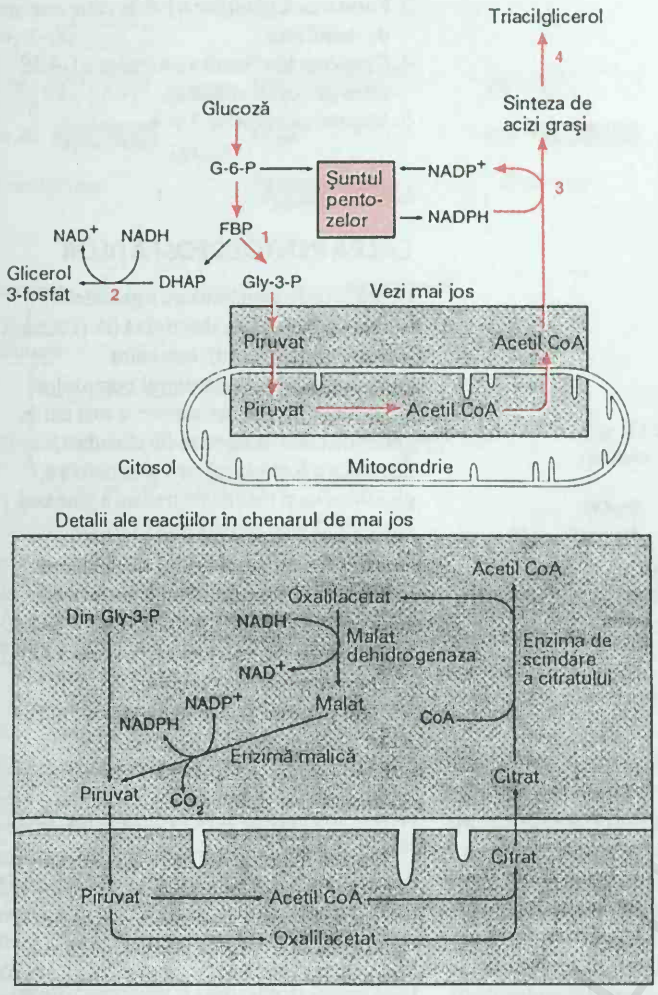


Fig. 11.13. Interacţiuni între căile metabolice în lipogeneză.

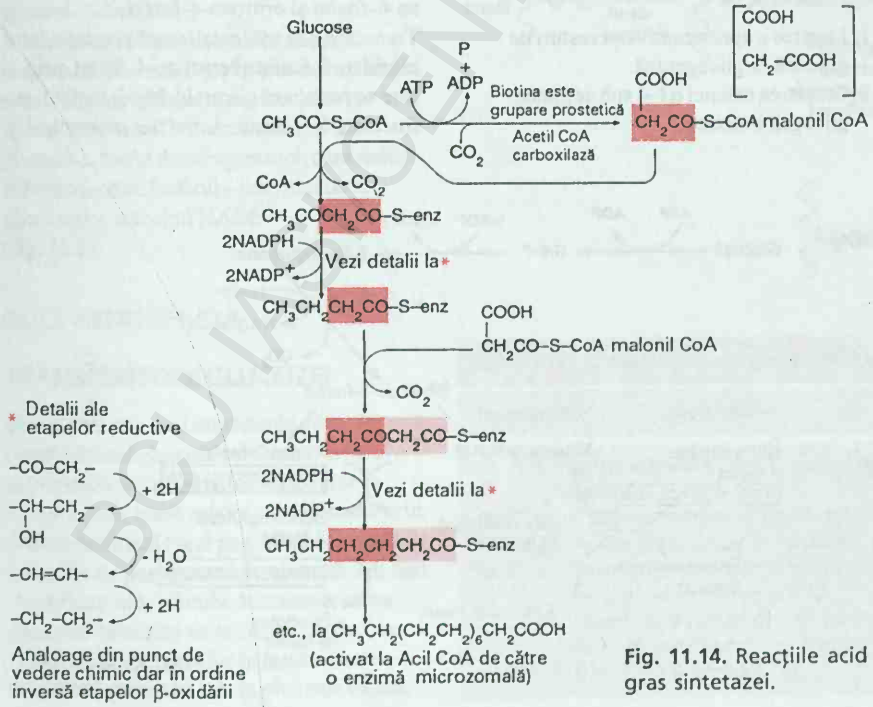


Fig. 11.14. Reacţiile acid gras sintetazei.

pentoze (două de xilulozo-5-fosfat şi una de ribozo-5-fosfat) duc la formarea a două molecule de fructozo-6-fosfat şi a uneia de gliceraldehid-3-fosfat.

ASPECTE GENERALE PRIVIND CONVERSIA GLUCOZEI LA TRIACILGLICEROLI

Lipogeneza pornind de la glucoză implică următoarele etape:

1. Conversia celei mai mari părţi a glucozei la acetil CoA, prin glicoliză şi piruvat dehidrogenază.
2. Formarea glicerol-3-fosfatului din o parte a dihidroxiacetonfosfatului format pe parcursul glicolizei.
3. Biosinteza acizilor graşi şi aşadar a acid gras CoA, din acetil CoA.
4. Biosinteza triacilglicerolilor din acid gras CoA şi glicerol-3-fosfat.

Aceste etape sunt rezumate în fig. 11.13. Aceeaşi figură prezintă o imagine amănunţită asupra reacţiilor implicate în conversia piruvatului la acetil CoA citosolică. Aceasta implică conversia unei părţi din piruvat la oxalilacetat, în mitocondrii. Oxalilacetatul şi acetil CoA se condensează formând citratul, care este apoi transportat în citosol. Acest citrat este apoi scindat din nou la acetil CoA şi oxalilacetat, acetil CoA fiind utilizată ca substrat pentru biosinteza acizilor graşi. Oxalilacetatul este redus la malat de către malat dehidrogenaza citosolică, iar malatul funcţionează apoi ca substrat pentru enzima malică, care catalizează o decarboxilare oxidativă pentru a forma din nou piruvatul. Totuşi, aceste două ultime etape realizează deasemenea transferul hidrogenului de la NADH la $NADP^+$ pentru a forma NADPH, care este apoi disponibil pentru biosinteza acizilor graşi, suplimentând pe cel furnizat de către calea pentozo- fosfaţilor, descrisă în secţiunea anterioară.

BIOSINTEZA ACIZILOR GRAŞI

Biosinteza acizilor graşi decurge prin condensarea de molecule cu doi atomi de carbon derivate din acetil CoA. Prima din aceste unităţi cu doi atomi de carbon este derivată direct din acetil CoA, unităţile ulterioarea fiind adăugate printr-un intermediar, malonil CoA. Reacţiile implicate sunt rezumate în fig. 11.14. Gruparea acetil este mai întâi transferată de la gruparea tiolică a CoA, la gruparea tiolică a unui rest de cisteină din enzima acid gras sintetază, formând acetil-enzima. Malonil CoA se formează prin fixarea CO_2 la gruparea metil a altei molecule de acetil CoA. La bacterii şi plante, sistemul enzimatic ce sintetizează acizii graşi implică o proteină separată cunoscută

BCU IAŞI CENTRALA UNIVERSITARĂ LIBRARY

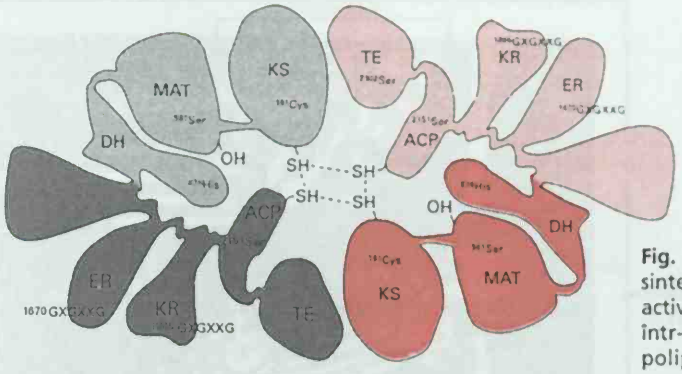


Fig. 11.15. Acid gras sintetaza are şase activităţi enzimatice într-o singură catenă polipeptidică.

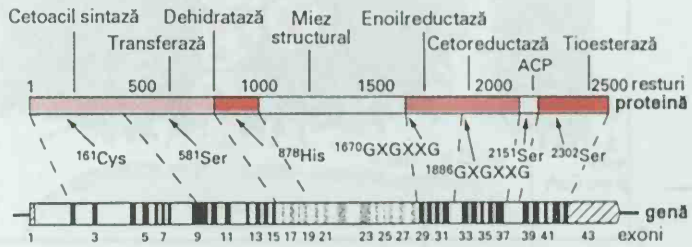


Fig. 11.16. Gena acid gras sintetazei are 43 de exoni.

ca proteina transportoare de acil (PTA). La animale, PTA este parte integrantă a catenei polipeptidice a acid gras sintetazei. În toate sistemele, PTA poartă o moleculă de pantoteină, similară cu cea din CoA. Aceasta este legată printr-o grupare fosfat la unul din resturile de serină din PTA. În biosinteza acizilor graşi, gruparea malonil a malonil CoA este transferată la gruparea tiolică a pantoteinei, gruparea acetil provenită din acetil CoA găsindu-se pe un rest de cisteină vecin. Reacţia dintre cele două grupări are loc apoi prin condensarea grupării acetil cu gruparea metilen a restului malonil. Gruparea carboxil care a fost fixată în procesul formării malonil CoA este pierdută în această reacţie. Rezultatul reacţiei este formarea unei grupări β-cetoacil cu patru atomi de carbon ataşată la PTA. Această grupare cu patru atomi de carbon este apoi transferată la cisteină şi o nouă moleculă de malonil CoA este ataşată la PTA. Urmează apoi o secvenţă similară de reacţii, rezultând o elongare a catenei cu doi atomi de carbon. Secvenţa de reacţii continuă până când sinteza acidului gras este terminată. În organismele animale sinteza continuă până la formarea acidului palmitic, iar acesta este eliberat şi convertit în palmitoil CoA de către o enzimă a reticulului endoplasmatic.

Structura acid gras sintetazei, descrisă în fig. 11.15, evidenţiază complexitatea la care poate ajunge o enzimă multifuncţională. Toate cele şase activităţi enzimatice sunt prezente într-o singură catenă polipeptidică formată din 2500 de aminoacizi: cetoacilsintetaza (KS-„KetoacylSyntase"), malonil/acetiltransferaza (MAT-„Malonil/Acetyl Transferase"), dehidrataza (DH-„DeHydrase"), enoilreductaza (ER-„Enoyl Reductase"), cetoreductaza (KR-„Keto Reductase"), şi tioesteraza (TE –„ThioEsterase"). O hartă a genelor la şobolan este prezentată în fig. 11.16. In raport cu mărimea proteinei, gena este foarte compactă (18 kilobaze), având introni relativ scurţi. Aceasta este posibil să fi apărut prin fuziunea genelor organizate într-un operon procariot, iar ipoteza este susţinută de faptul că la câteva procariote din zilele noastre gene similare sunt aranjate în „clustere" din interiorul operonilor.

STRUCTURA ACIZILOR GRAŞI

Acidul palmitic, sintetizat de către acid gras sintetază, este doar unul dintre numeroşii acizi graşi necesari organismului animal. Structurile unora dintre acizii graşi uzuali întâlniţi în biomembrane şi în lipidele plantelor şi animalelor sunt prezentate în fig. 11.17. Aşa cum este indicat mai departe, acizii graşi pot fi simbolizaţi printr-o convenţie în care numărul total de atomi de carbon este urmat de două puncte şi apoi de numărul legăturilor duble. Astfel, acidul palmitic este simbolizat 16:0. În denumirea acizilor graşi, poziţia legăturilor duble poate fi indicată în unul dintre următoarele moduri:

1. Pornind de la gruparea carboxil, când se utilizează simbolul Δ. În acest sistem, acidul linoleic este indicat prin simbolul $\Delta^{9,12}$.
2. Pornind de la gruparea metil terminală a catenei principale, când se utilizează simbolul n- (sau ω-). În acest sistem, acidul linoleic este simbolizat n-6,9 sau ω-6,9.

În conversia acizilor graşi în molecule cu grad mai mare de nesaturare sunt implicate câteva desaturaze. Desaturazele sunt denumite utilizând prima convenţie descrisă mai sus, adică folosind pentru denumire poziţia primei legături duble. Astfel, Δ^4 – desaturazele introduc o legătură dublă între C-4 şi C-5. În afara acestora, mai există Δ^5 – şi Δ^9 – desaturaze. La mamifere nu există desaturaze care să introducă legături duble în regiunea arătată în fig. 11.18. –

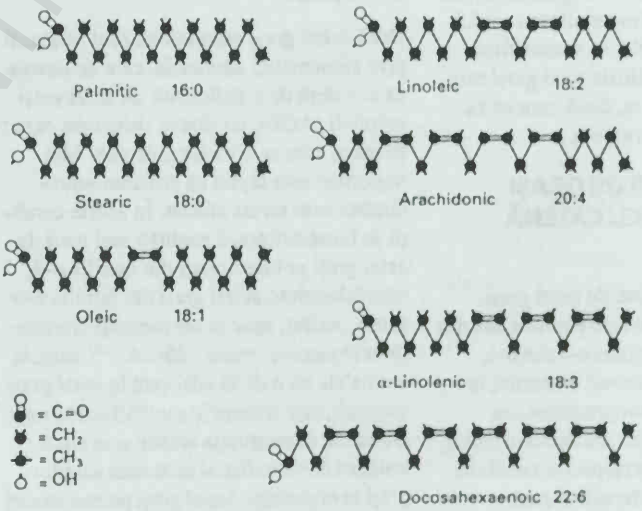


Fig. 11.17. Structura acizilor graşi.

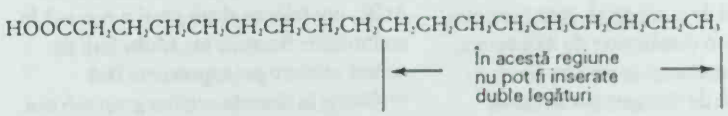


Fig. 11.18. Legăturile duble nu pot fi introduse între al nouălea atom de carbon şi atomul de carbon terminal al catenei acizilor graşi.

Acid linoleic (18:2 ω-6,9) —desaturare→ Acid γ-linolenic (18:3 ω-6,9,12) → Acid arahidonic (20:4 ω-6,9,12,15)

familia ω-3

Acid α-linolenic (18:3 ω-3,6,9) —Elongare + desaturare→ Acid decosahexaenoic (22:6 ω-3,6,9,12,15,18)

familia ω-9

Deoarece legăturile duble pot fi introduse în poziția ω-9-10 și în puncte mai apropiate de gruparea carboxil, acești acizi pot fi sintetizați din acid palmitic, care la rândul său poate fi sintetizat din acetil CoA

Acid palmitic → Acid stearic → Acid oleic → Acid eicosatrienoic (20:3 ω-9,12,15)

Fig. 11.19. Familii de acizi grași polinesaturați.

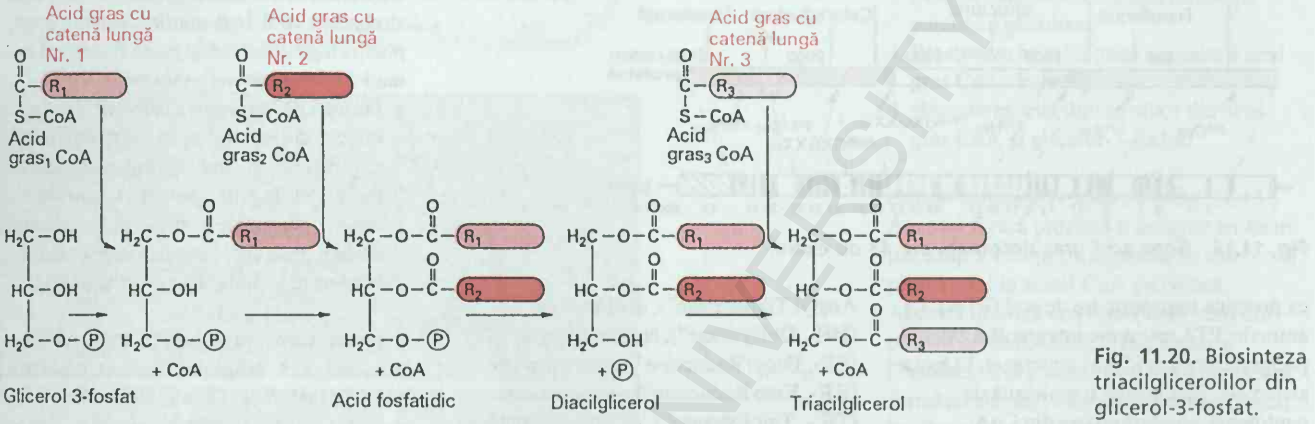


Fig. 11.20. Biosinteza triacilglicerolilor din glicerol-3-fosfat.

adică între carbonul C-9 și gruparea metil terminală. Astfel, deoarece mamiferele au nevoie de acizi grași cu legături duble în această parte a catenei, precursorii care conțin astfel de legături duble trebuie asigurați prin alimentație, purtând din această cauză numele de acizi grași esențiali. Exemple de acizi grași esențiali sunt acidul linoleic și acidul α-linolenic, aceștia fiind precursori ai unor familii de acizi grași care se pot biosintetiza din ei, după cum se va explica în secțiunea următoare.

BIOSINTEZA ACIZILOR GRAȘI POLINESATURAȚI CU CATENĂ LUNGĂ

Există trei familii majore de acizi grași; aceștia sunt derivați din acid palmitic sau din precursori cu duble legături n-3 sau n-6. Acești acizi grași sunt uneori denumiți, în funcție de principalul lor precursor, ca: familia acidului palmitic (sau acidului oleic), familia acidului linoleic respectiv a acidului α-linolenic. Totuși, preferabil ei sunt denumiți ca familiile n-9, n-6 sau n-3. Aceste familii de acizi grași sunt biosintetizate de către o combinație de desaturaze, menționate anterior, și de enzime de elongare. Enzimele de elongare pot adiționa unități cu doi atomi de carbon la capătul carboxil al moleculelor de acil CoA, utilizând acetil CoA ca și donor de unități cu doi atomi de carbon. O schemă a familiilor de acizi grași care se pot forma este prezentată în fig. 11.19.

DEFICIENȚA DE ACIZI GRAȘI ESENȚIALI

Dacă acizii grași esențiali nu sunt asigurați prin alimentație, animalele, care au nevoie de ei suferă de o deficiență de acizi grași esențiali (AGE), cu câteva simptome caracteristice cum ar fi pielea solzoasă. Mai important este faptul că sistemul reproducător este serios afectat. În aceste condiții se biosintetizează cantități mai mari de acizi grași polinesaturați din familia n-9, care înlocuiesc acizii grași din familia n-6 și n-3. Astfel, apar în ser cantități crescute de acid eicosatrienoic - 20:3 $\Delta^{5,8,11}$ care, la animalele cu o dietă adecvată în acizi grași esențiali, este prezent în cantități foarte mici. De aceea, concentrația acestui acid poate fi utilizată ca un indice al statusului acizilor grași în organism. Acizii grași polinesaturați n-9, biosintetizați în cazul deficienței de AGE, pot înlocui acizii grași n-6 și n-3 în multe dintre funcțiile lor. Multe linii de culturi celulare pot supraviețui fără probleme în absența acizilor grași n-6 sau n-3. Aceștia din urmă sunt necesari animalelor superioare pentru funcții specializate, în particular pentru biosinteza prostaglandinelor și a unor eicosanoide înrudite.

BIOSINTEZA TRIACILGLICEROLILOR

În etapa finală a lipogenezei se biosintetizează triacilglicerolii. Primele etape implică fixarea a două molecule de acil CoA la glicerol-3-fosfat, pentru a forma acidul fosfatidic. Acesta este hidrolizat la diacilglicerol, care mai departe este acilat pentru a forma triacilglicerolul, așa cum este prezentat în fig. 11.20.

SECREȚIA TRIACILGLICEROLILOR DE CĂTRE FICAT

În timpul stării absorbtive, în ficat se biosintetizează cantități mari de triacilgliceroli, care sunt exportați pentru a fi preluați și stocați în țesutul adipos. Triacilglicerolii sunt secretați de către ficat sub formă de lipoproteine; descrise detaliat în Capitolul 12. Clasa de lipoproteine în care sunt încorporați triacilglicerolii din ficat este cunoscută sub numele de lipoproteine cu densitate foarte scăzută (VLDL - Very Low Density Lipoproteins). Enzimele biosintezei triacilglicerolilor sunt localizate în reticulul endoplasmatic neted. Triacilglicerolii se deplasează în aparatul Golgi unde, împreună cu colesterolul, fos-

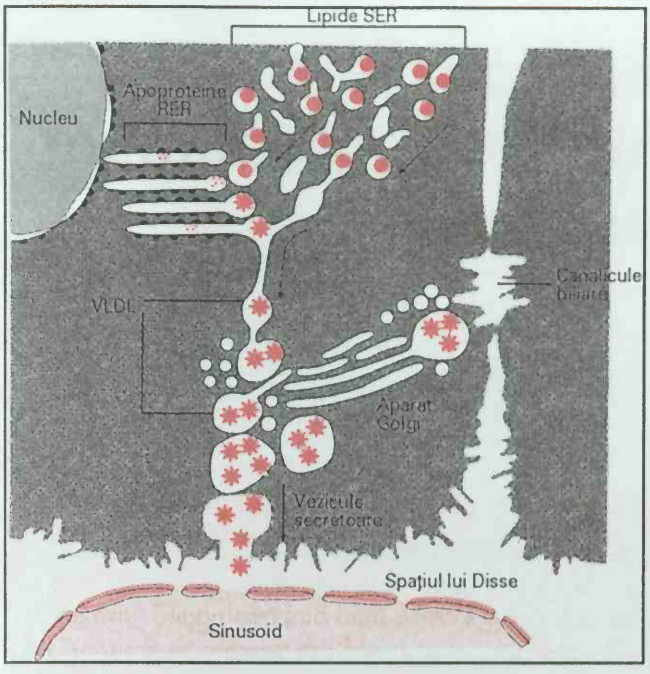


Fig. 11.21. VLDL sunt extrudate din veziculele secretoare în spaţiul Disse.

folipidele şi proteine specifice, cunoscute sub numele de apolipoproteine (sau simplu, apoproteine, pag. 152), formează particulele lipoproteice. În cazul VLDL, proteinele încorporate sunt apoproteina B-100 (apoB-100) şi câteva forme de apoC (a se vedea Capitolul 12), care au fost sintetizate în reticulul endoplasmic rugos. Lipoproteinele din plasmă conţin un număr de alte apoproteine, toate acestea fiind biosintetizate în reticulul endoplasmic rugos al ficatului, apo A şi apo E fiind secretate de către ficat în particulele lipoproteice de densitate mare (HDL - High Density Lipoproteins). Aşa cum se descrie în fig. 11.21., veziculele ies din membranele Golgi şi extrudează lipoproteinele în canaliculele biliare.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Lipoproteinele plasmatice, metabolismul colesterolului și ateroscleroza

12

Toate lipidele sunt transportate în sânge sub forma lipoproteinelor plasmatice, dintre care cele mai importante sunt lipoproteinele cu densitate scăzută şi lipoproteinele cu densitate mare. Lipoproteinele cu densitate scăzută conţin cantităţile cele mai mari de colesterol, fiind asociate cu forma familială a ischemiei cardiace. Aceasta a dus la concentrarea atenţiei asupra rolului colesterolului în ateroscleroză, ca factor ce grăbeşte producerea infarctului miocardic. Singurul proces oxidativ implicat în excreţia colesterolului este cel al conversiei acestuia în acizi biliari. Strategiile terapeutice utilizate pentru scăderea nivelului colesterolului plasmatic implică izolarea acizilor biliari, pentru a preveni reabsobţia lor din intestin şi utilizarea medicamentelor care inhibă biosinteza hepatică a colesterolului.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

LIPOPROTEINELE PLASMATICE ŞI METABOLISMUL COLESTEROLULUI

COMPOZIŢIA LIPOPROTEINELOR PLASMATICE

Toate lipidele circulă prin sânge sub forma unor ansambluri mari de lipide şi proteine, numite lipoproteine. Două dintre aceste tipuri de lipoproteine se biosintetizează în ficat: lipoproteinele cu densitate foarte scăzută (VLDL) şi lipoproteinele cu densitate mare (HDL). O altă clasă de lipoproteine o constituie chilomicronii, sintetizaţi în intestin în timpul absorbţiei lipidelor, secretaţi în sistemul limfatic şi de acolo, în sânge. O altă componentă majoră a lipoproteinelor plasmatice sunt lipoproteinele cu densitate scăzută (LDL), care se formează în sânge, în principal din VLDL. Dacă plasma este supusă electroforezei iar evidenţierea lipidelor se face prin colorare, se observă o serie de benzi corespunzătoare acestor clase de lipoproteine, aşa cum se prezintă în fig. 12.1. În această figură sunt redate şi câteva detalii referitoare la structura lipoproteinelor. În separarea electroforetică îşi are originea şi un sistem alternativ de nomenclatură a lipoproteinelor. Astfel, HDL, care migrează cu viteza cea mai mare, au fost iniţial denumite á-lipoproteine. Cealaltă bandă mai proeminentă pe separare, reprezintă LDL şi au fost denumite â-lipoproteine. O altă bandă, mai puţin proeminentă, conţine VLDL, care migrează în faţa LDL, au fost denumite pre-â-lipoproteine. Aceste analize se efectuează frecvent pe plasma sanguină recoltată într-o perioadă de repaus alimentar, când chilomicronii sunt absenţi. Atunci când sunt prezenţi, chilomicronii rămân aproape de origine.

În fig. 12.2 este prezentată, sub forma unei diagrame, compoziţia lipoproteinelor. Tot aici sunt prezentate şi diferitele apoproteine asociate diferitelor clase de lipoproteine. Acestea includ o clasă suplimentară de lipoproteine, IDL (lipoproteine de densitate intermediară, a se vedea mai jos), care sunt un produs al metabolismului lipoproteinelor în plasmă. O analiză mai detaliată a apolipoproteinelor a pus în evidenţă faptul că ele pot fi mai departe subdivizate în polipeptide distincte, aşa cum se indică în figură, şi, aşa cum va fi explicat ulterior, unele dintre acestea s-au dovedit a avea funcţii specifice.

Proteina Apo B din chilomicroni este o moleculă mai mică decât cea asociată cu VLDL, aşa cum este explicat la p. 34. Apo B sintetizată de către ficat are o M_r de 514000 şi este simbolizată B-100 pentru a o distinge de cea sintetizată de către intestin, apo B-48, astfel denumită deoarece reprezintă aproximativ 48 % din mărimea lui B-100.

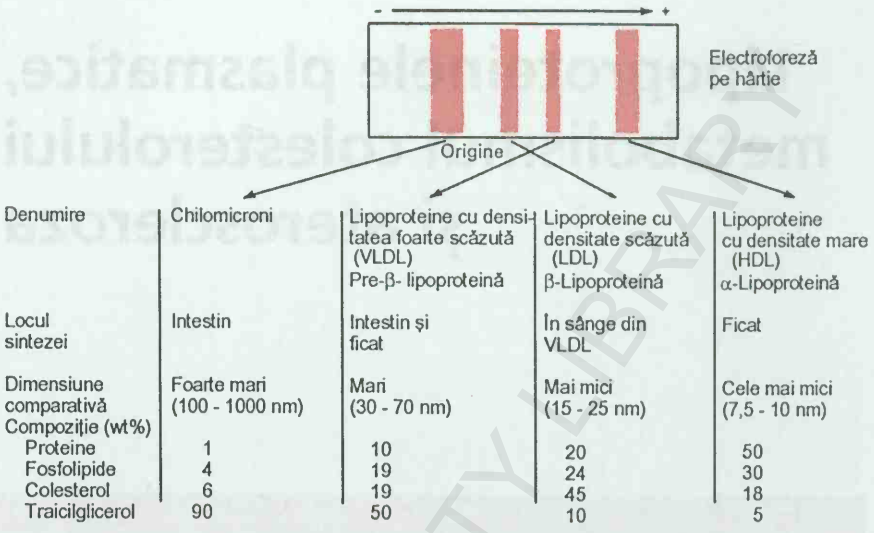


Fig. 12.1. Structura lipoproteinelor plasmatice.

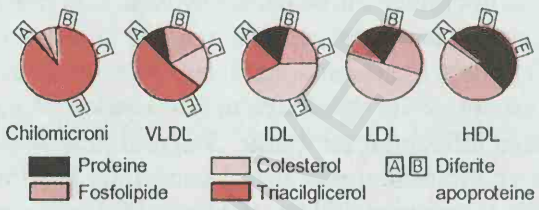


Fig. 12.2. Compoziţia lipoproteinelor plasmatice.

METABOLISMUL CHILOMICRONILOR

Celulele marginii în perie a intestinului sintetizează triacilgliceroli din acizi graşi şi din glucoza absorbită din intestin după o masă. Triacilglicerolii sunt împachetaţi, cu cantităţi mici de colesterol şi fosfolipide, în chilomicroni. Pentru sinteza chilomicronilor sunt deasemenea necesare apoproteine, şi anume: apo B-48, A-I, A-II şi A-IV. Chilomicronii absorbiţi din intestin intră în sistemul limfatic, iar după o masă bogată în lipide, produc o limfă cu aspect lăptos, cunoscută sub numele de „chyle" (de aici şi numele lor). În fluidul interstiţial, chilomicronii preiau apo C şi apo E de la HDL. Apoi ei intră în circulaţia sanguină conferind plasmei, dacă sunt în cantitate suficient de mare, un aspect lăptos. Triacilglicerolii pe care aceştia îi conţin sunt degradaţi de către enzime cunoscute ca lipaze lipoproteice (denumite înainte factori de clarefiere, deoarece limpezesc plasma cu aspect lăptos). Lipazele lipoproteice sunt localizate pe suprafaţa externă a celulelor endoteliale. Particulele lipoproteice preiau deasemenea şi colesterol de la HDL. Rolul lipazelor lipoproteice este de a reduce proporţia de triacilgliceroli din aceste particule (prezentat în fig. 12.3) cât şi de a reduce dimensiunea lor, pentru a forma particule cu conţinut scăzut de triacilgliceroli şi un conţinut ridicat de esteri ai colesterolului. Aceste particule, cunoscute sub numele de „resturi" („remnants") sunt în continuare metabolizate prin preluarea lor intactă în celulă, de către receptori specifici. Apoproteina apo E, pe care chilomicronii o preiau de la HDL este importantă prin faptul că ea este ligandul recunoscut de către receptorii din membrana plasmatică a celulelor hepatice.

FORMAREA LDL DIN VLDL

Particulele de VLDL secretate în plasmă de către ficat sau intestin sunt deasemena supuse acţiunii lipazei lipoproteice, reducându-se astfel proporţia de triacilgliceroli pe care îi conţin, cât şi dimensiunea lor. Apoproteina apo C-II este importantă ca

Fig. 12.3. Acţiunea lipazei lipoproteice asupra chilomicronilor.

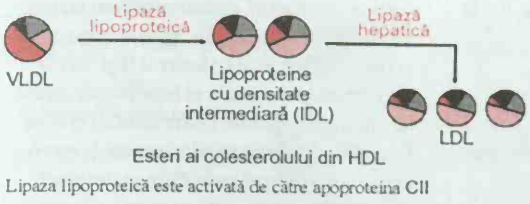


Fig. 12.4. Acțiunea lipazei lipoproteice asupra VLDL.

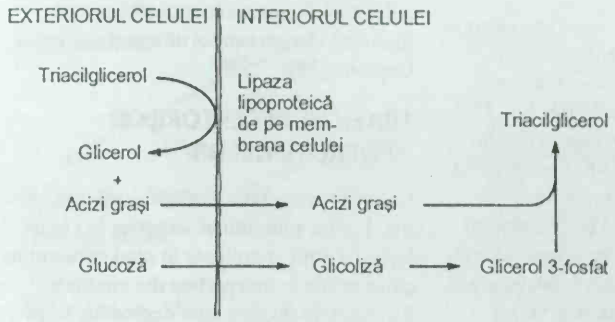


Fig. 12.5. Preluarea acizilor grași de către țesuturile periferice.

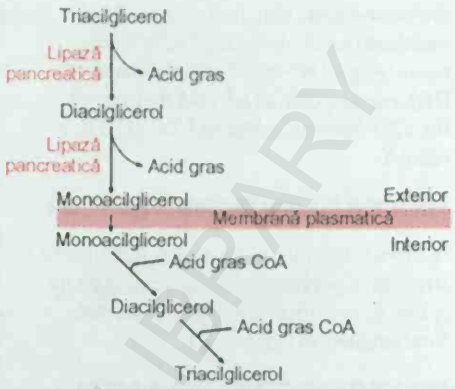


Fig. 12.6. Absorbția triacilgliceroliilor implică degradare și resinteză.

activator al lipazei lipoproteice. Aceste particule mai mici acceptă esteri ai colesterolului de la HDL, pentru a forma o clasă de lipoproteine cu dimensiuni și densitate mai mici, cunoscute ca lipoproteine cu densitate intermediară (IDL).
Esterii colesterolului se formează în HDL, pe parcursul maturizării lor, așa cum este explicat mai jos. Asupra particulelor mai mici de VLDL și IDL acționează alte lipaze, localizate în membrana plasmatică a celulelor hepatice și cunoscute ca lipaze hepatice. Acestea degradează ulterior triacilgliceroliii, reducând proporția acestora în VLDL și IDL. Rezultatul acestor transformări, așa cum se prezintă în fig. 12.4, este formarea LDL.

PRELUAREA ACIZILOR GRAȘI DE CĂTRE CELULE

Acizii grași eliberați de către lipaza lipoproteică sunt preluați de către celulele țesuturilor periferice, în special de cele ale țesutului adipos (fig. 12.5).

Acizii grași sunt transportați prin membrana plasmatică a celulelor și încorporați în triacilgliceroliii intracelulari. Aceștia sunt biosintetizați așa cum a fost descris la p. 148, fiind deci necesară o suplimentare a cantității de glicerol-3-fosfat, derivat din reducerea dihidroxiacetonfosfatului produs în glicoliză. Glicerolul eliberat în plasmă de către lipaza lipoproteică este preluat de către ficat și reacționează cu ATP pentru a forma glicerol-3-fosfat, ca rezultat al acțiunii glicerol kinazei. După oxidarea la dihidroxiacetonfosfat, el este metabolizat prin procesele de glicoliză sau de gluconeogeneză.

În celulele intestinale și hepatice, funcționează și un sistem alternativ, în care acid gras CoA se fixează pe monoacilglicerol (fig. 12.6).

FORMAREA HDL

În ficat se formează particule precursoare ale HDL, sub acțiunea unor sisteme enzimatice din aparatul Golgi, înrudite cu cele prezentate anterior și combină apoproteinele sintetizate în reticulul endoplasmic rugos cu lipidele sintetizate în reticulul endoplasmic neted. Aceste particule precursoare conțin două forme de apo A, apo A-I și apo A-II - ca principale apoproteine, împreună cu apo E. Ele au formă discoidală și sunt bogate în colesterol neesterificat și fosfatidilcolină (cunoscută și sub denumirea de lecitină). După secreția lor în plasmă, asupra acestor precursori acționează lecitin-colesterol aciltransferaza (LCAT), care transferă un acid gras de la lecitină la colesterol. Ca rezultat, molecula devine mai bogată în esteri

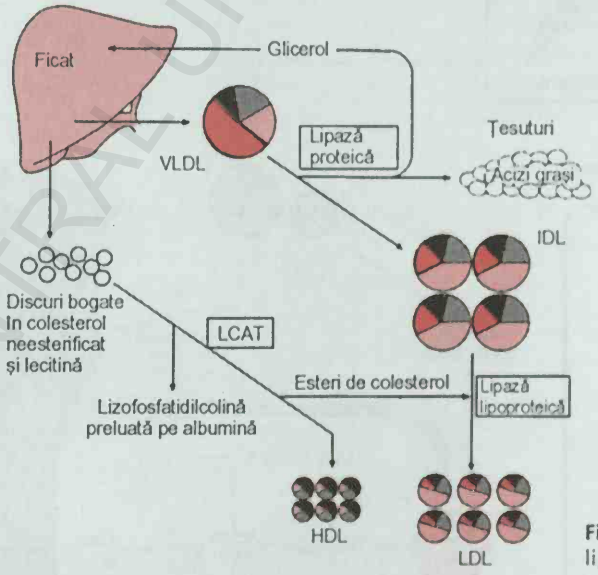


Fig. 12.7. Metabolismul lipoproteinelor în plasmă.

Tabelul 12.1. Funcțiile apolipoproteinelor

Apoproteina	Funcția
A-I	Activează lecitin-colesterol aciltransferaza
B-100	Este recunoscută de către receptorii celulelor hepatice și ai altor celule din sistemul circulator periferic și joacă un rol important în preluarea de către aceste celule a lipoproteinelor care transportă această apoproteină.
C-II	Activează lipaza lipoproteică. O deficiență a acestei apoproteine a fost în unele cazuri asociată cu un nivel ridicat al triacilglicerolilor în plasmă.
E	Celulele hepatice conțin receptori pentru apo E, ceea ce este important pentru preluarea eficientă de către celulele hepatice a lipoproteinelor care o conțin.

ai colesterolului, unii dintre aceştia fiind transferaţi particulelor de LDL în maturizare. Aceste procese duc la formarea de HDL mature, care au o formă mai sferică. fig. 12.7. rezumă formarea LDL şi HDL în plasmă.

FUNCŢIILE APOLIPOPROTEINELOR

În afara rolului lor în crearea şi menţinerea structurii lipoproteinelor, apoproteinele au şi funcţii specifice, unele dintre acestea fiind detaliate în tabelul 12.1.

PREZENTARE GENERALĂ A METABOLISMULUI LIPOPROTEINELOR

Fig. 12.8 rezumă şi reuneşte diferitele evenimente metabolice, discutate anterior, referitoare la traficul lipoproteinelor. LDL este principalul vehicul pentru transportul colesterolului de la ficat spre alte ţesuturi ale organismului unde, sub formă neesterificată reprezintă un component major al membranelor plasmatice. LDL au cel mai ridicat conţinut de colesterol (sub formă esterificată) dintre toate lipoproteinele. LDL interacţionează cu membranele celulelor ţesuturilor periferice, transferându-le colesterol. Pe de altă parte, HDL are capacitatea de a îndepărta colesterolul din aceste membrane. Aceste două lipoproteine par a interveni în menţinerea nivelului colesterolului, împreună cu alte mecanisme discutate mai jos.

BIOSINTEZA COLESTEROLULUI

Nivelul colesterolului circulant a atras atenţia ca factor în etiologia unor boli umane, în special a aterosclerozei. Colesterolul este biosintetizat în ficat din acetil CoA. Fig. 12.9 subliniază procesele enzimatice ce duc la biosinteza squalenului din 3-hidroxi-3-metil glutaril CoA (HMG CoA) citosolică, sinteză descrisă la p. 137. Aceste etape nu vor fi discutate în detaliu, dar prima enzimă indicată în figură, HMG CoA reductaza, are un rol primordial în reglarea biosintezei colesterolului. La rândul lor, intermediarii - farnesil difosfat şi geranil difosfat - sunt molecule importante (a se vedea, de exemplu, p. 185).

Metabolismul izopentenil fosfatului (care nu este prezentat aici în detaliu) duce la formarea unui compus cu 30 de atomi de carbon, squalenul, din intermediari cu şase şi cinci atomi de carbon. Squalenul poate fi apoi transformat în colesterol (fig. 12.10). Deşi principalul sediu al biosintezei colesterolului este ficatul, şi alte ţesuturi cum ar fi: cortexul suprarenalelor, organele reproducătoare şi fibroblastele din piele (mult utilizate pentru în culturi pentru a studia metabolismul colesterolului) pot sintetiza colesterol. Reglarea acestui proces este discutată într-un capitol ulterior (a se vedea Capitolul 13).

TRAFICUL RECEPTORILOR LIPOPROTEINELOR

Lipoproteinele au o viaţă limitată în plasmă. Ele nu sunt numai secretate în circulaţie dar sunt şi preluate în mod constant de către celule şi îndepărtate din circulaţie. Lipoproteinele sunt apoi degradate, în cazul proteinelor până la aminoacizii constituenţi, iar în cazul lipidelor la acizi graşi şi produşi de degradare ai glicerolului. Colesterolul nu poate fi oxidat la dioxid de carbon şi apă, reglarea nivelului său fiind tratată într-o secţiune ulterioară (p. 157). Sinteza şi degradarea lor continuă este o parte importantă a mecanismelor de reglare a nivelului lipoproteinelor circulante. Procesul este ilustrat în fig. 12.11, în care metabolismul LDL şi receptorilor lor sunt utilizate ca exemplu. Procese similare sunt implicate în metabolismul HDL şi resturilor chilomicronilor. Membranele plasmatice ale celulelor hepatice şi ale unor celule

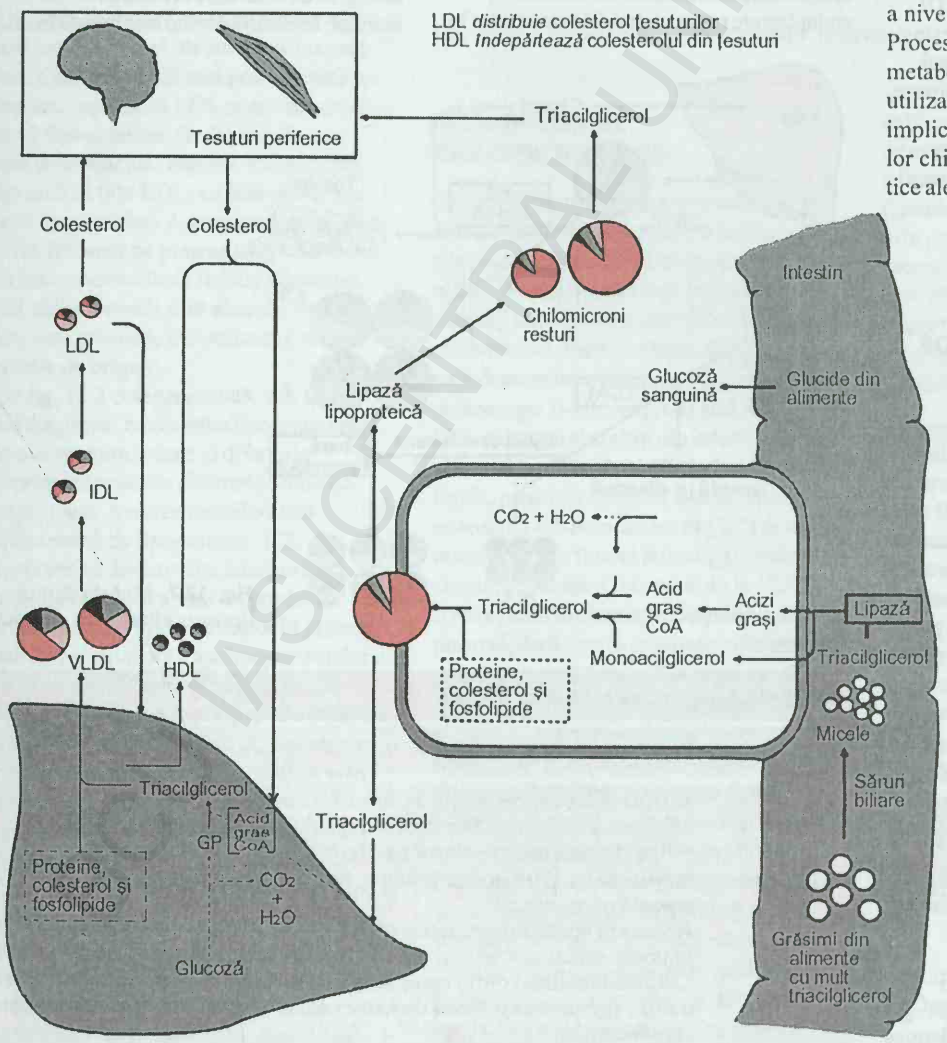
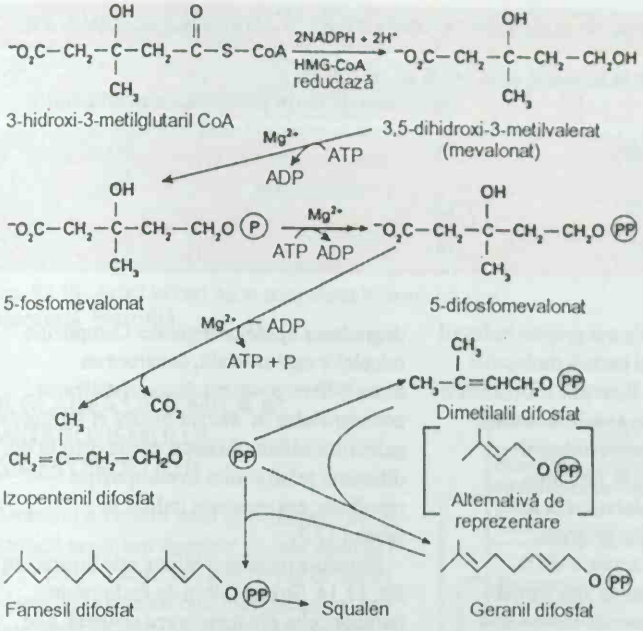


Fig. 12.8. Schema de ansamblu a metabolismului lipoproteinelor.



3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductaza (HMG-CoA reductaza) este o enzimă cheie importantă ce reglează biosinteza colesterolului

Fig. 12.9. Biosinteza compușilor izoprenoidici.

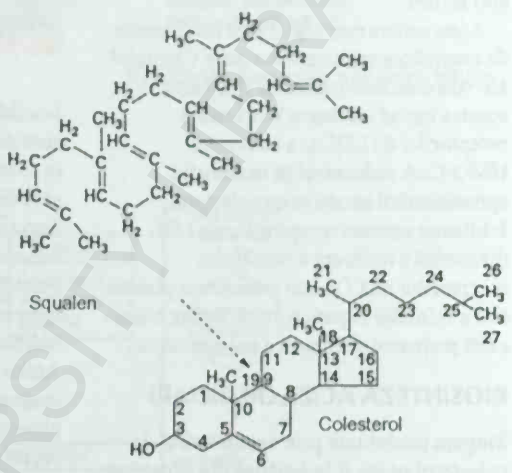


Fig. 12.10. Formarea colesterolului din squalen.

ale sistemului fagocitar mononuclear conțin receptori care recunosc apoproteinele B sau E. În cazul LDL, ligandul important este apo B-100. Aceasta este recunoscută de către receptori specifici care se acumulează în invaginări ale membranei plasmatice („coated pits") acoperite pe suprafața internă cu clatrină, o proteină descrisă mai detaliat la p. 194. Legând LDL, membrana se pliază în vezicule care devin organite, cunoscute ca endozomi, iar acestea cedează conținutul lor lizozomilor. Acest sistem vezicular de preluare este descris mai detaliat în Capitolul 15. În lizozomi se desfășoară procesele degradative menționate mai sus. O parte a colesterolului este re-esterificat și stocat ca și esteri ai colesterolului, iar o parte este excretată ca și acizi biliari, așa cum este explicat mai jos. Totuși, nivelul colesterolului intracelular poate regla biosinteza unor noi receptori de LDL care sunt necesari pentru înlocuirea receptorilor înglobați în endozomi prin endocitoză, așa cum este prezentat la p. 193.

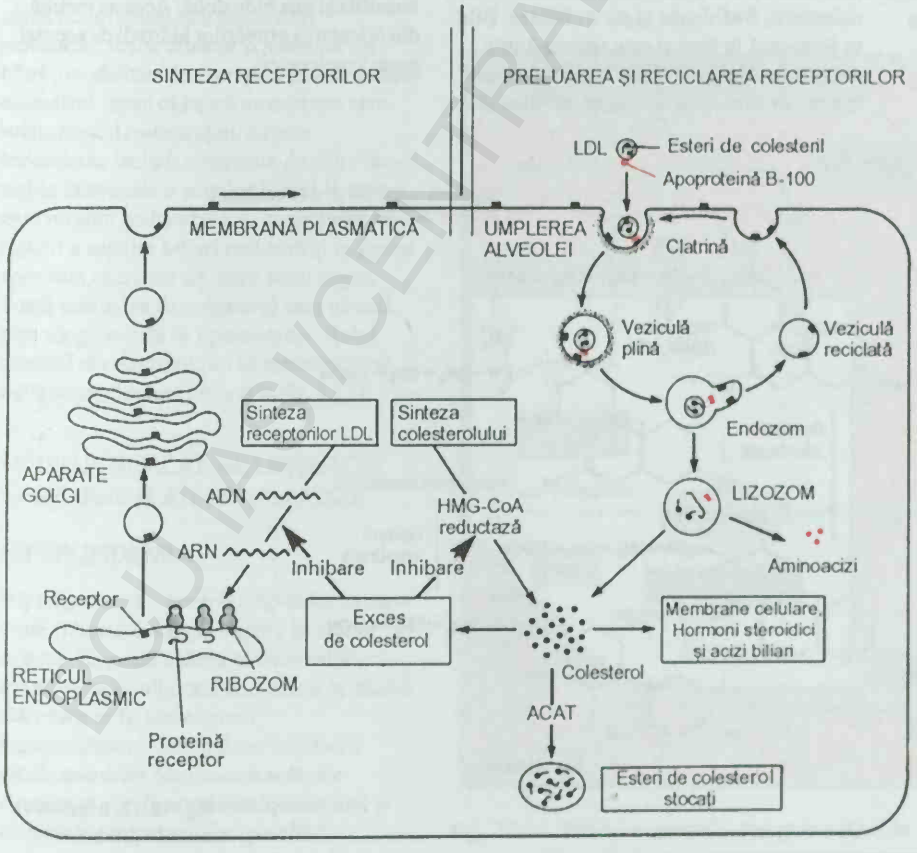


Fig. 12.11. Reciclarea receptorului LDL.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Aşa cum se prezintă în fig. 12.11, noii receptori de LDL înaintează în cele din urmă din reticulul endoplasmic rugos, prin aparatul Golgi la membrana plasmatică, unde se acumulează în invaginările căptuşite cu clatrină („clathrin coated pits") sub formă de receptori neocupaţi, pregătiţi pentru a lega apo B-100.

Acest sistem este reglat prin mecanisme de control complicate descrise în Capitolul 15. Aşa cum este indicat în fig. 12.11, acestea includ inhibarea biosintezei receptorilor de LDL şi a activităţii HMG-CoA reductazei în momentul aprovizionării excesive cu colesterol. Inhibarea sintezei receptorilor de LDL determină o reducere a numărului receptorilor de LDL din membrana plasmatică a celulelor hepatice, reducând în consecinţă preluarea ulterioară a colesterolului.

BIOSINTEZA ACIZILOR BILIARI

Singura modalitate prin care excesul de colesterol poate fi îndepărtat din organism este prin excreţia lui în bilă, fie direct, fie prin transformarea lui în acizi biliari. Procesul de biosinteză al acizilor biliari este complex şi nu va fi descris în detaliu. Acesta implică câteva transformări ale moleculei de colesterol care sunt rezumate în fig. 12.12. Se biosintetizează astfel două serii distincte de acizi biliari, producându-se acidul colic şi acidul chenodeoxicolic. Din aceştia, bacteriile intestinale pot biosintetiza acidul colic şi acidul litocolic. Structurile acizilor biliari sunt prezentate în fig. 12.12. Enzima reglatoare a biosintezei acizilor biliari este 7á-hidroxilaza, care introduce gruparea hidroxil în poziţia 7á.

Tabelul 12.2. Diferenţa de compoziţie a bilei normale şi anormale este relativ mică

Componentă	Bilă normală (%)	Bilă anormală (%) (prelevată de la un pacient cu calculi biliari)
Lecitină	74	71
Săruri biliare	20	13
Colesterol	6	16

În acidul colic, toate cele trei grupări hidroxil sunt dispuse pe aceeaşi parte a moleculei (a se vedea fig. 12.13). Reacţiile biosintetice sunt direcţionate pentru a realiza această dispunere. Astfel, gruparea hidroxil existentă deja în moleculă, gruparea hidroxil-3â a colesterolului, trebuie inversată pentru a obţine gruparea hidroxil-3á din acidul colic.
Acizii biliari sunt excretaţi sub formă conjugată, ca acid taurocolic sau ca acid glicocolic. In acidul taurocolic, taurina este legată de acidul colic printr-o legătură de tip amidic între gruparea carboxil a acidului colic şi gruparea amino a taurinei. Taurina ($H_2NCH_2CH_2SO_3H$) este formată prin decarboxilarea cisteinei şi oxidarea grupării tiolice la grupare sulfonică (-SH › -SO_3H). Acidul glicocolic conţine glicocol legat de acidul colic în acelaşi fel.

BILA

Bila este o soluţie complexă de săruri şi proteine, care conţine micele alcătuite din colesterol, fosfolipide şi săruri biliare. Bila se formează în ficat şi este secretată prin ductul biliar în vezica biliară, de unde trece în intestin. Aici, sărurile biliare facilitează degradarea lipidelor ingerate. Compoziţia micelelor este crucială, deoarece un dezechilibru poate produce cristalizarea colesterolului în vezica biliară şi formarea calculilor biliari. Aceasta poate rezulta din diferenţe relativ mici în compoziţia micelelor, aşa cum este indicat în tabelul 12.2.

Structura micelelor biliare este ilustrată în fig. 12.14. Stratul dublu de fosfolipide (similar celui din membrana celulară, a se vedea p. 184), în care este inserat colesterol, formează un disc cu suprafaţă ionică plată deasupra şi dedesubt. În jurul marginilor acestor discuri, acizii biliari se leagă prin faţa lor hidrofobă de catenele hidrofobe ale fosfolipidelor, iar faţa hidrofilă a sărurilor biliare este dispusă spre mediul apos, ca suprafaţă hidrofilă. Această dispunere este posibilă datorită stereochimiei acizilor biliari, ilustrată în fig. 12.13. Sărurile biliare sunt un tip special de detergenti, dar, în timp ce detergenţii obisnuiţi au un capăt hidrofil si unul hidrofob, sărurile biliare au o faţă hidrofilă şi una hidrofobă. Aceasta rezultă din orientarea grupărilor hidroxil de aceeaşi parte a moleculei.

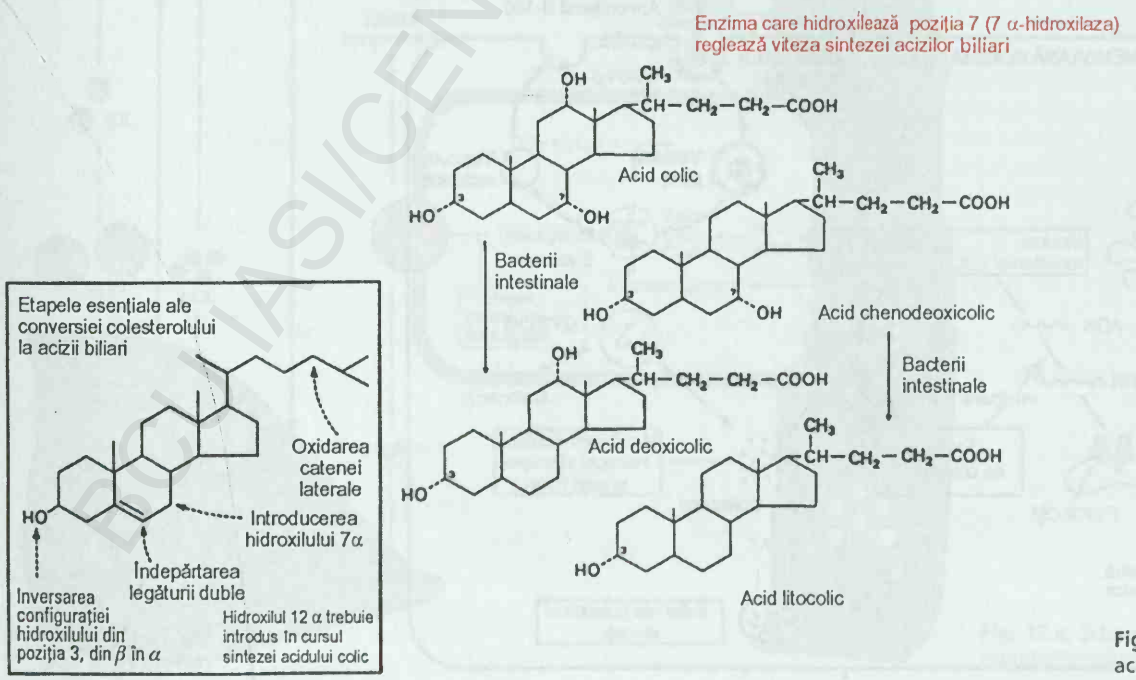


Fig. 12.12. Biosinteza acizilor biliari.

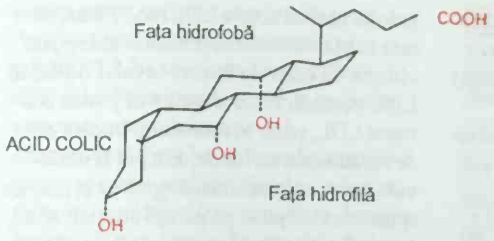


Fig. 12.13. Acizii biliari au o suprafață hidrofobă și o suprafață hidrofilă.

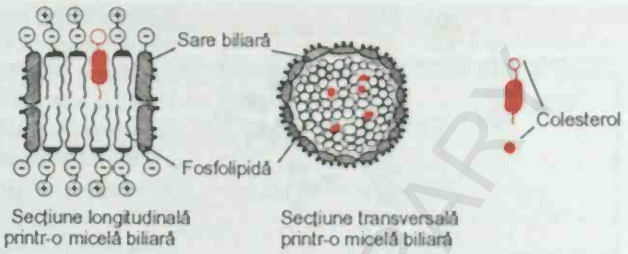


Fig. 12.14. Structura micelelor biliare.

REGLAREA SISTEMICĂ A METABOLISMULUI COLESTEROLULUI

Controlul nivelului total al colesterolului în întregul organism depinde de rata excreției lui în bilă, ca atare sau sub formă de săruri biliare, în relație cu rata biosintezei lui în ficat. Rata biosintezei colesterolului este reglată prin retroinhibiția HMG-CoA reductazei de către excesul de colesterol, așa cum s-a arătat deja. Astfel, dacă în ficat intră o cantitate mare de colesterol, ca rezultat al ingestiei de colesterol, rata biosintezei va fi diminuată. Excesul de colesterol poate micșorat prin excreția lui în bilă, direct sau sub formă de săruri biliare. Sistemele implicate în acest proces sunt prezentate în fig. 12.15. Din fericire, pentru indivizii din țările prospere cu o dietă tipică bogată în colesterol, absorbția colesterolului la nivel intestinal nu este foarte eficientă. Totuși, acizii biliari ajunși în intestin sunt reabsorbiți foarte eficient și astfel nu vor oferi o modalitate de excreție a colesterolului, exceptând faptul că există mecanisme care reduc efectul reabsorbției. Aceste mecanisme includ: conversia de către bacteriile intestinale a acizilor biliari la forme care nu sunt reabsorbite și, conjugarea în rinichi a acizilor biliari reabsorbiți la forme care sunt excretate de către acest organ. Toată cantitatea de colesterol care circulă prin sânge se află în lipoproteine. Rolul esențial al colesterolului în metabolismul lipoproteinelor este ilustrat în fig. 12.16.

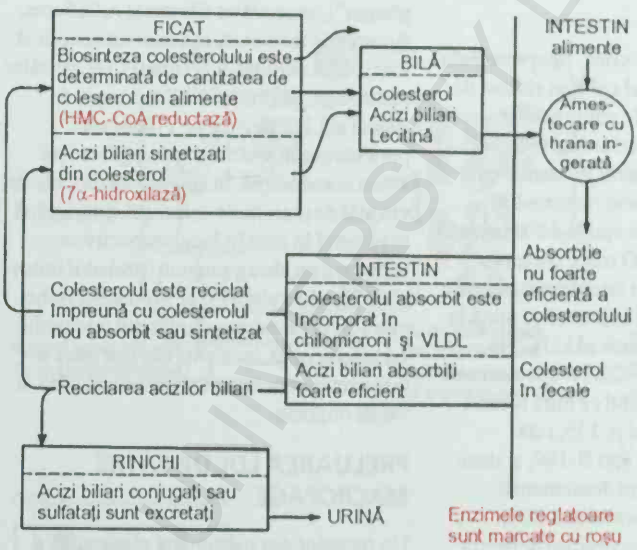


Fig. 12.15. Schema de ansamblu a metabolismului general al colesterolului.

NIVELUL RIDICAT AL LIPIDELOR SANGUINE ȘI ATEROSCLEROZA

HIPERLIPIDEMIA

Hiperlipidemia – prezența lipidelor în cantitate ridicată în sânge – apare în câteva situații. Ea poate apărea în mod relativ obișnuit, ca o tulburare secundară în câteva stări cum ar fi: alcoolismul, hipotiroidismul, diabetul sau utilizarea medicamentelor. Secțiunea următoare abordează clasificarea hiperlipidemiilor și cauzele hiperlipidemiilor specifice.

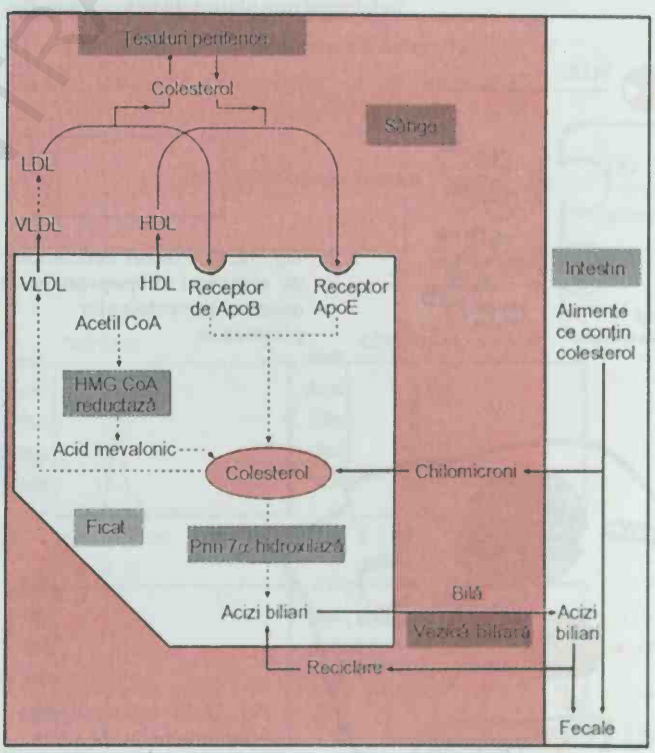


Fig. 12.16. Rolul lipoproteinelor plasmatice în metabolismul colesterolului.

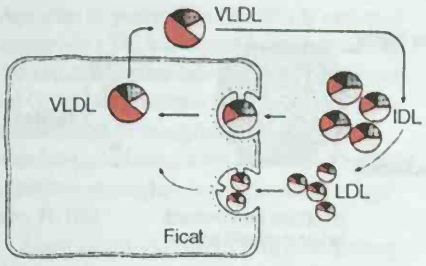


Fig. 12.17. Reciclarea VLDL, IDL şi LDL.

HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIALĂ

Aşa cum s-a afirmat anterior, lipoproteinele plasmatice cu conţinutul cel mai ridicat de colesterol sunt LDL. Ele sunt reciclate permanent în ficat prin intermediul receptorilor de apo B-100. IDL sunt deasemenea preluate de către ficat prin intermediul receptorilor ce recunosc apo B-100 şi apo E (a se vedea fig. 12.17). O mare parte din IDL sunt îndepărtate din circulaţie înainte de transformarea lor în LDL, proces ce ajută la reglarea nivelului plasmatic al LDL. Nu numai activitatea HMG-CoA reductazei este reglată de către colesterolul ce intră în ficat ci, aşa cum s-a indicat la p. 155, rata biosintezei receptorilor apo B-100, şi deci numărul de receptori sunt deasemenea reglate de către rata de preluare a LDL.

Anumiţi indivizi moştenesc un defect în biosinteza receptorilor funcţionali de apo B. Acesta determină hipercolesterolemia familială clasificat ca şi tipul II de hiperlipidemie. La homozigoţi, această deficienţă este severă şi duce la niveluri extrem de ridicate ale LDL (şi deci a colesterolului) în sânge (a se vedea fig. 12.18). La heterozigoţi, o alelă este funcţională astfel că această stare este mai puţin severă. La homozigoţi, deficienţa este suficient de severă pentru ca ateroscleroza să fie evidentă deja la copii sau adulţi tineri, ducând în unele cazuri chiar la moartea la o vârstă tânără. Ateroscleroza este termenul ce defineşte îngroşarea pereţilor arteriali de către aşa numitele plăci, ce constau în macrofage pline de lipide („lipid-laden macrophages"), asociată cu fibroza şi calcifierea. Acestea se formează, aşa cum este explicat mai jos, ca rezultat al preluării LDL de către macrofage, datorită nivelului excesiv de ridicat al LDL circulante. Plăcile sunt periculoase în special când se găsesc pe artera coronariană. În anumite cazuri, ele devin atât de mari încât ocluzează artera până în punctul în care în locul respectiv se formează un cheag sanguin (probabil indus chiar de către placă) şi se produce o ischemie severă ce cauzează infarctul miocardic. La heterozigoţi, incidenţa cea mai mare a infarctului miocardic este întârziată pâna la vârsta mijlocie.

PRELUAREA LDL DE CĂTRE MACROFAGE

Un receptor din membrana plasmatică a macrofagelor este capabil să recunoască LDL, şi în special LDL ce au suferit modificări ca rezultat al circulării un timp mai îndelungat prin plasmă. Odată ce macrofagele au preluat aceste LDL modificate, nu mai există mecanisme prin care să le poată elibera. În cazurile în care nivelul ridicat al LDL persistă, macrofagele vor prelua continuu LDL, până în momentul în care ele devin saturate cu lipide. Ele pot fi observate într-o secţiune histologică ca şi „celule spumoase" depuse pe pereţii arteriali (a se vedea fig. 12.19). Macrofagele depozitează colesterolul esterificat în picături de lipide, colesterolul fiind esterificat mai degrabă cu un rest oleil decât cu un rest linoleil, cu care este mai frecvent esterificat colesterolul din plasmă. Aşa cum este prezentat în fig. 12.19, LDL modificate sunt încorporate în vezicule (2) şi degradate în particulele lizozomale (3). LDL sunt total degradate, proteina fiind degradată la aminoacizi. Fosfolipidele şi triacilglicerolii sunt degradate la acizi graşi şi glicerol-3-fosfat sau glicerol, iar esterii colesterolului la colesterol şi acizi graşi. Acizii graşi, indicaţi prin linoleat (4), sunt degradaţi în mitocondrii la acetil CoA din care se formează oleatul. In reticulul endoplasmic, oleatul şi colesterolul formează colesteriloleatul (5) care se acumulează în picăturile de lipide (6).

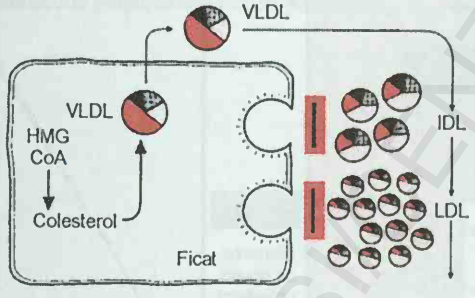


Fig. 12.18. Efectul deficienţei de receptori ai lipoproteinelor asupra lipoproteinelor plasmatice.

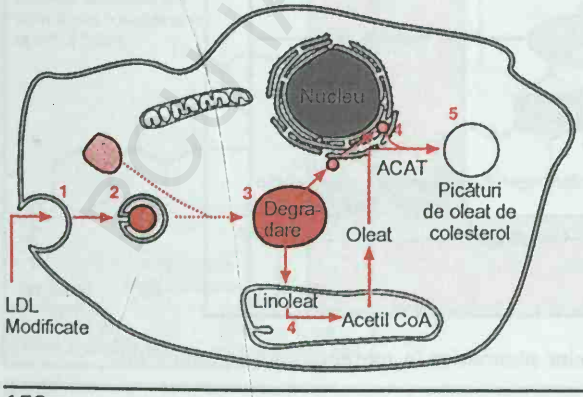


Fig. 12.19. Metabolizarea lipoproteinelor de către macrofage. A se vedea textul pentru detalii.

STRATEGII TERAPEUTICE DE SCĂDERE A COLESTEROLULUI PLASMATIC

Au fost obţinute medicamente, cum sunt compactinul şi mevinolinul (lovastatin), care inhibă HMG-CoA reductaza, inhibând astfel biosinteza colesterolului. Efectul acestor medicamente poate fi mărit prin administrarea simultană a unui agent ce previne reabsorbţia acizilor biliari, crescând deci conversia colesterolului la acizi biliari. Dacă se administrează oral o răşină schimbătoare de anioni (una dintre cele utilizate în terapie fiind cunoscută sub numele de colestiramină), aceasta nu va fi degradată în intestin ci va parcurge intestinul legând acizii biliari prezenţi şi determinând excreţia lor în fecale (fig. 12.20).

CLASIFICAREA HIPERLIPIDEMIILOR

Cea mai simplă clasificare a hiperlipidemiilor constă în difenenţierea lor în funcţie de nivelul ridicat al colesterolui sau al triacilglicerolilor. Nivelurile ridicate de colesterol sunt asociate cu consecinţe mai grave asupra stării sănătăţii, aşa cum a fost explicat mai sus, dar şi nivelurile ridicate ale triacilglicerolilor se corelează, în mai mică măsură, cu starea de boală. În multe cazuri această clasificare este suficientă. Totuşi, deoarece încărcătura de lipide a sângelui este localizată în lipoproteine, hiperlipidemiile au fost de asemenea clasificate în diferite tipuri de hiperlipoproteinemii, descrise

pentru prima dată de către Fredrickson. Această clasificare este prezentată în tabelul 12.3. Examinarea compoziției diferitelor lipoproteine (p. 152) arată clar cum apar aceste diferențe.

Diagnosticul tipurilor de hiperlipoproteinemie se poate realiza prin electroforeza proteinelor plasmatice, urmată de detecția lipoproteinelor prin utilizarea unui colorant pentru lipide. Câteva exemple sunt date în fig. 12.21. O analiză mai vastă poate fi realizată prin utilizarea unei ultracentrifugi analitice. În acest instrument, lipoproteinele sunt stratificate într-o soluție salină în celula centrifugei și supuse unei centrifugări la valori mari ale g. Prezența proteinelor determină o modificare a indicelui de refracție al soluției, iar rotorul este astfel construit încât o rază de lumină poate fi direcționată prin soluție. Aceasta permite măsurarea indicelui de refracție în diferite puncte ale celulei. Modelul („pattern") obținut din soluții conținând diferite amestecuri de lipoproteine sunt prezentate în fig. 12.22. La densitățile de sare utilizate, lipoproteinele se deplasează spre centrul rotorului, adică plutesc cu o viteză determinată de densitatea particulelor. Abscisa este marcată în unități care reprezintă viteza cu care plutesc diferitele componente ale soluției, numite unități de plutire Svedberg (S_f). Ordonata indică cantitatea din oricare component în anumite puncte din celulă. Așa cum se poate vedea, există un spectru continuu de particule cu densități diferite în cadrul fiecărui domeniu de densitate. Aceasta se întâmplă deoarece moleculele lipoproteice, chiar și în cadrul unei anumite clase cum ar fi VLDL, au o mare varietate de dimensiuni și densități. Diferențele se datorează faptului că lipoproteinele au o compoziție variabilă, dependentă de măsura în care au acționat enzimele implicate în metabolismul lor. Astfel moleculele de LDL cuprind domeniul cu S_f 0-20, iar moleculele VLDL, domeniul cu S_f peste 20. Trebuie observat nivelul foarte ridicat al LDL în hipercolesterolemia familială (clasificată ca și tipul II de hiperlipidemie), atât de ridicat încât scala ordonatei a trebuit să fie modificată.

ACIZII GRAȘI POLINESATURAȚI DIN DIETĂ ȘI ATEROSCLEROZA

Tipurile și cantitățile diferiților acizi grași din dietă (adică profilul acizilor grași) sunt reflectate în profilul acizilor grași din lipoproteinele plasmatice. Crescând cantitatea de linoleat din dietă, va crește nivelul linoleatului în toate tipurile de lipoproteine, așadar și raportul dintre acizii grași polinesaturați și acizii grași saturați, cunoscut ca raportul P/S. Aceasta duce și la modificări ale profilului acizilor grași din

Tabelul 12.3. Clasificarea hiperlipidemiilor

Tipul Fredrickson	Lipoproteină cu nivel ridicat	Nivel de colesterol	Nivel de triacilglicerol
I	Chilomicroni (sau VLDL)	+	+ + +
IIa	LDL	+ + +	±
IIb	LDL și VLDL	+ +	+ +
III	LDL "plutitor"	+ + +	+ + +
IV	VLDL	±	+ +
V	VLDL și chilomicroni	+	+ + +

± normal până la ușor crescut; ++ moderat crescut ; +++ mult crescut

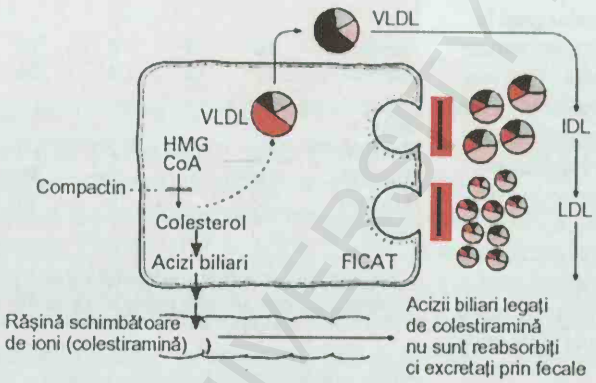


Fig. 12.20. Strategii de scădere a colesterolului plasmatic.

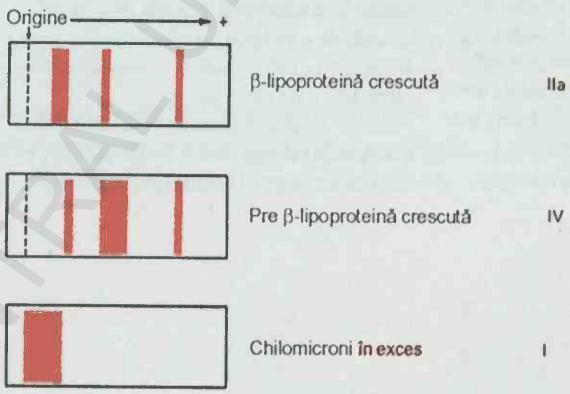


Fig. 12.21. Diagnosticul hiperlipidemiilor prin electroforeză.

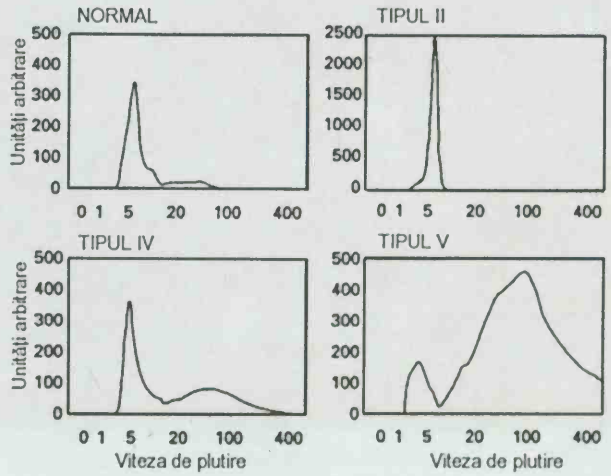


Fig. 12.22. Lipoproteinele separate în ultracentrifugă.

lipidele ţesuturilor. Astfel, contrar cazului glucidelor şi proteinelor, natura lipidelor din dieta unui individ exercită o influenţă calitativă asupra compoziţiei lipidelor corporale. Din motive care nu sunt complet înţelese, creşterea raportului P/S determină o scădere a nivelului lipidelor plasmatice şi astfel poate scădea nivelul plasmatic al colesterolului. S-a recomandat, de către comisii avizate, că este de dorit ca raportul P/S să fie mai mare de 2, cu toate că acesta este dificil de realizat fără a modifica substanţial dieta normală a populaţiei din ţările vestice. Motivul pentru care acest deziderat este greu de îndeplinit poate fi înţeles examinând profilul acizilor graşi în diferite tipuri de carne şi de ulei, prezentate în tabelul 12.4. Se poate observa că peştele şi grăsimea de pasăre au niveluri comparativ ridicate de acizi graşi polinesaturaţi, şi că aceste alimente sunt preferate în recomandările nutriţionale pentru reducerea riscului bolilor cardiovasculare. Chiar şi aşa, raportul P/S nu atinge în nici un caz valoarea 2 în aceste alimente. În peşte, aceşti acizi graşi aparţin familiei de acizi graşi cu catenă lungă n-3, şi ingerarea de ulei de peşte tinde să scadă mai degrabă nivelul triacilglicerolilor plasmatici decât nivelul colesterolului (din nou, motivele nu sunt bine înţelese). Nu toate uleiurile utilizate pentru gătit sunt la fel de bogate în acizi graşi polinesaturaţi, dar în această privinţă uleiurile sunt preferate grăsimilor solide animale, mai saturate şi care au o valoare mică a raportului P/S. Adăugarea în dietă a uleiurilor, cum ar fi uleiul de porumb sau seminţe de floarea soarelui, (de exemplu prin utilizarea lor la gătit) este singura modalitate realmente eficientă de a creşte semnificativ raportul P/S. Ea trebuie însoţită de o reducere a consumului de grăsimi cu grad ridicat de saturare cum ar fi carnea de oaie sau vită.

Tabelul 12.4. Profilul acizilor graşi în grăsimi şi uleiuri

Grăsime sau ulei	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2 (ω-6)	20:4 (ω-6)	20:5 (ω-3)	22:6 (ω-6)
Grăsimi animale								
Vacă	35	3	20	36				
Oaie	27		31	32				
Porc	30	3	11	42	11			
Iepure	27	9	3	28	20			
Pui	18	10	5	34	17			
Raţă	21	6	6	49	16			
Curcan	23	7	8	32	25			
Peşte								
Hering	15	12	2	21	3	1 (20:1 ω-9, 15%) (22:1 ω-11, 16%)	9	6
Sardine	16	9	3	11	1	2	17	13
Somon	11	5	4	24	5	5	5	17
Ulei								
Măsline	10		2	78	7			
Porumb	10		2	30	50			
Floarea soarelui	6		6	18	69			

Compoziţia variază considerabil de la o probă la alta. Sunt prezentaţi doar acizii graşi selecţionaţi dar valorile reprezintă % din totalul acizilor graşi prezenţi.

Acizii graşi polinesaturaţi sunt localizaţi frecvent în poziţia sn-2 a fosfolipidelor, în timp ce acizii graşi saturaţi predomină în poziţia sn-1; totuşi în ciuda acestei reguli generale, există şi fosfolipide cu doi acizi graşi nesaturaţi sau cu doi acizi graşi saturaţi. Una dintre acestea din urmă, dipalmitoilfosfatidilcolina, este un agent tensioactiv („surfactant") din plămâni, a cărui concentraţie este un indicator al maturităţii plămânului fetal.

BCU IASI/CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY

Acțiunea hormonilor și a altor efectori în reglarea metabolismului glicogenului, glucozei, cetogenezei și lipogenezei

13

La nivel sistemic, metabolismul glucidic şi lipidic este reglat hormonal. În repausul alimentar hormonii care au rol major sunt glucagonul, adrenalina, glucocorticoizii şi adrenocorticotropina (ACTH). Aceşti hormoni stimulează în mod diferit eliberarea glucozei din glicogenul hepatic, a aminoacizilor din proteinele musculare şi a acizilor graşi din depozitul adipos. În procesele de absorbţie, insulina are acţiune opusă acestor hormoni şi este responsabilă de scăderea glucozei sanguine, stimularea preluării glucozei în muşchi şi activarea căilor metabolice de sinteză a glicogenului şi triacilglicerolului.

Pe termen scurt, aceşti hormoni acţionează prin sisteme de mesageri secundari, incluzând AMP ciclic şi produşii fosfoinozitol-specifici rezultaţi prin acţiunea fosfolipazei C. Aceştia stimulează în succesiune protein kinaze şi protein fosfataze.

Sistemele enzimatice sunt de asemenea controlate la nivel de exprimare genică, prin structura promotorilor şi interacţiunea lor cu factori specifici de transcriere, care determină cum şi când genele sunt activate sau reprimate.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

INTERACȚIUNI SISTEMICE

STRATEGIE GENERALĂ DE CONTROL

Integrarea căilor metabolice pentru glucide și lipide este o trăsătură metabolică importantă la toate speciile. Discuția de mai jos se concentrează asupra mamiferelor. La aceste animale, hormonii joacă un rol dominant asupra acestor căi metabolice.

La ingestia alimentelor de către mamifere, metabolismul intermediar al glucidelor și lipidelor e dominat de influxul metaboliților dinspre intestin. Cei mai importanți metaboliți sunt glucoza (derivați din glucide) și triacilglicerolii (derivați din acizi grași eliberați din lipidele ingerate). În această situație insulina este cel mai important factor de control. Așa cum este arătat în figura 13.1, principala sa acțiune este stimularea sintezei glicogenului din glucoză, în mușchi și ficat și sinteza triacilglicerolilor în ficat și țesut adipos. La prima vedere pare surprinzător că triacilglicerolii sunt sintetizați în ficat când ei de fapt au fost obținuți în celulele intestinului și absorbiți ca și componente ale chilomicronilor, așa cum s-a explicat în secțiunea de lipoproteine plasmatice. Chilomicronii de altfel, funcționează ca vehicule pentru transportul acizilor grași absorbiți, care apoi sunt sortați și restructurați în acord cu necesitățile organismului. Compoziția acizilor grași din dietă este numai parțial reflectată de lipidele din țesuturi, întrucât ficatul și alte țesuturi efectuează procese de restructurare, oxidând anumiți acizi grași, sintetizând alții, menținând raporturile necesare între lipidele potrivite pentru necesitățile celulare. Triacilglicerolii țesutului adipos conțin puțini acizi grași polinesaturați. Deși o cantitate importantă din acizii grași absorbiți este preluată și incorporată în triacilgliceroli direct de țesuturi periferice, în special țesut adipos, ficatul este țesutul principal implicat în stabilirea compoziției în acizi grași. Ficatul are și funcția suplimentară de menținere a concentrațiilor potrivite de diferite lipoproteine plasmatice, așa cum se explică în capitolul 12 și va fi esențial pentru sinteza fosfolipidelor pentru VLDL și HDL din acizii grași ingerați. Excesul de glucide este transformat de ficat în triacilglicerol pe căi lipogenetice și această conversie reprezintă o funcție majoră a ficatului în procesul de absorbție.

În contrast cu situația menționată mai sus, în starea de repaus alimentar acțiunea insulinei este moderată în schimb alți hormoni cum sunt glucagonul, glucocorticoizii, adrenalina, ACTH (adrenocorticotropina) și hormonul de creștere vor acționa în căi metabolice directe, așa cum se menționează în figura 13.2. Cantitatea de glucoză ce poate rezulta din degradarea glicogenului hepatic este limitată. Utilizarea de către țesuturile periferice a corpilor cetonici, sintetizați de acizii grași mobilizați din țesut adipos și conversiile la corpi cetonici în ficat, reduce cantitatea de glucoză utilizată ca și combustibil. Utilizarea rezervelor de lipide din țesut adipos în loc mușchi este benefică, pentru că pe termen lung de inaniție, mușchii sunt esențiali pentru supraviețuire

Hormonii acționează în principal prin mecanisme discutate în capitolul 6 și anume ca și mesageri secundari și în fosforilarea proteinelor. În plus, căile metabolice considerate nu sunt reglate de hormoni. De exemplu, la contracția musculară, este o necesitate imediată de producere a GTP din glicogen muscular, o creștere a fluxului glicolitic dacă susținerea cu ATP este menținută și astfel, controlul procesului nu e hormonal.

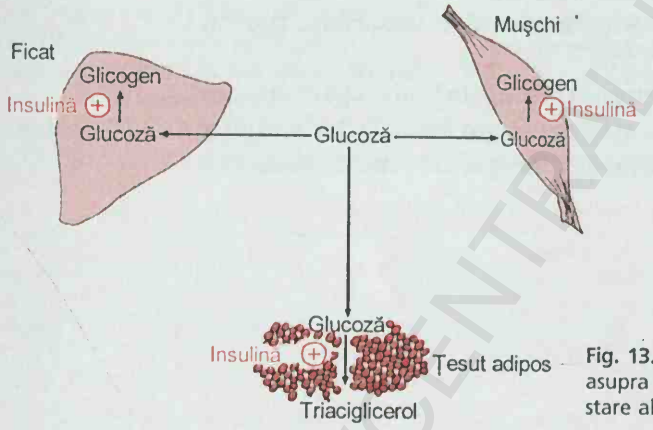


Fig. 13.1. Efectul hormonilor asupra metabolismului în stare absorbtivă.

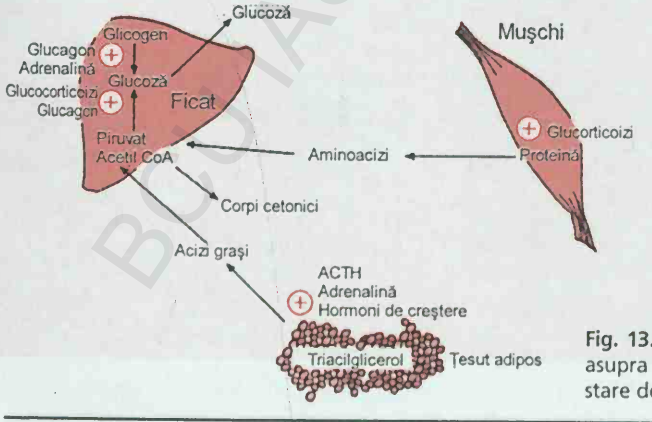


Fig. 13.2. Efectul hormonilor asupra metabolismului în stare de repaus alimentar.

REGLAREA METABOLISMULUI GLICOGENULUI

METABOLISMUL GLICOGENULUI ÎN MUȘCHI

Reacțiile implicate în metabolismul glicogenului în mușchi sunt prezentate în figura 13.3. Acțiunea opusă a glicogensintetazei și fosforilazei în acest ciclu sunt dominante și enzimologia implicată în reglare este foarte complexă. În plus, contribuția glicogeninei (vezi p. 144) poate fi importantă, deși încă nu e clarificată.

Glicogensintetaza musculară are nouă situsuri de fosforilare, indicate în figura 13.4. Aceste situsuri sunt fosforilate de câteva kinaze, incluzând PKA (proteinkinaza cAMP-dependentă), cazeinkinaza 2 și glicogensintaz-kinaza 3 (GSK-3). Glicogensintetaza hepatică nu are situsurile de fosforilare 1a și 1b. Un număr de proteinkinaze au fost clasificate drept glicogensintetaz-kinaze datorită acțiunilor de fosforilare a glicogensintetazei la diferite situsuri, ele includ GSK-1 care este o PKA și GSK-2, o fosforilaz-kinază. GSK-5 este cazeinkinaza 2. GSK-3 fosforilează trei situsuri, după ce alte situsuri au fost fosforilate.

BUCUREȘTI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

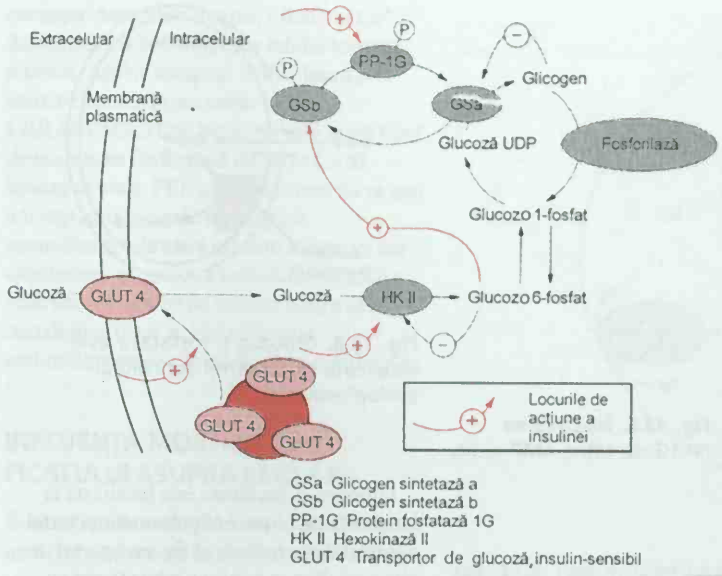


Fig. 13.3. Acțiunea insulinei asupra metabolismului glicogenului muscular.

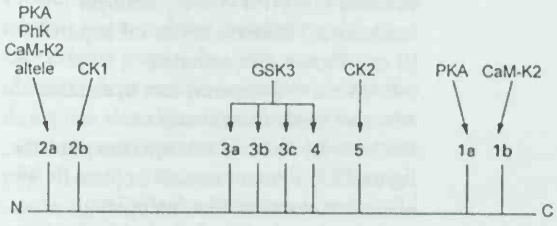


Fig. 13.4. Glicogen sintetaza musculară are nouă situsuri de fosforilare.

Fosforilarea enzimei determină conversia ei de la forma GSa independentă de glucozo-6-fosfat, cunoscută inițial ca forma I, la o formă mai puțin activă, cunoscută inițial ca forma D, numită acum GSb, care este dependentă de glucozo-6-fosfat. Trecerea de la o formă la alta nu se face în sistem „totul sau nimic" ci sub forme intermediare, cu diferite grade de fosforilare în celulă și cu sensibilitate intermediară față de Glucozo-6-fosfat. Fosforilaza este fosforilată de o fosforilaz-kinază la un singur situs, așa cum este arătat în pag. 87, rezultând o formă mai activă care nu depinde de AMP pentru a fi activată. Astfel, acțiunea kinazelor tinde să promoveze glicogenoliza.

Fosforilaz-kinaza este cea mai mare dintre protein kinaze. Este o enzimă hexadecamerică, formată dintr-un complex de patru tetrameri identici (subunități α, β, γ, δ) și este activată de PKA. Subunitatea δ este în fapt o moleculă de calmodulină care mediază rolul reglator al Ca^{2+} în metabolismul glicogenului. Ca^{2+} activează de asemenea PKC care este kinaza responsabilă pentru fosforilarea glicogensintetazei.

Proteinfosfataza-1 (PP-1G) acționează asupra glicogensintetazei b și fosforilazei a. Această proteinfosfatază are o subunitate catalitică C și o subunitate reglatoare G. Subunitatea reglatoare G îi determină subclasificarea și este responsabilă pentru legarea la glicogen.

Glicogenul se găsește în particule mari ce includ enzime de metabolizare a glicogenului (glicogensintetaza, fosforilaza, fosforilazkinaza, proteinfosfataza-1) enzime responsabile atât pentru sinteza cât și pentru degradarea glicogenului care sunt în contact cu glicogenul și direcția căii metabolice depinde de stadiul mecanismelor reglatoare.

EFECTUL INSULINEI ASUPRA METABOLISMULUI GLICOGENULUI ÎN MUȘCHI

Insulina stimulează sinteza glicogenului în mușchi prin controlul influxului de glucoză prin transportor GLUT 4 (vezi p. 144), molecule pe care le preia din membrana plasmatică (figura 13.3.). Ca rezultat este stimulată formarea de glucozo-6-fosfat. Este activată cascada protein-kinazică, care are următoarele efecte:

- inhibarea GSK3 și astfel activarea glicogensintetazei (forma fosforilată a glicogensintetazei GSk este forma mai puțin activă; astfel, dacă kinaza este inhibată, va domina acțiunea fosfatazei și va determina activarea).
- fosforilarea PP-1G, activând-o; aceasta stimulează acțiunea fosfatazei asupra fosforilazei, care astfel este inactivată (p. 136)
- activarea glicogensintetazei și inhibarea fosforilazei care induce o biosinteză a glicogenului

Detalii suplimentare privind mecanismele prin care insulina induce aceste efecte sunt prezentate în p. 187

METABOLISMUL GLICOGENULUI ÎN FICAT

Influxul de glucoză în ficat nu este insulin-dependent. GLUT2 este transportorul de glucoză în ficat și eliberează glucoza pentruglucokinaza care reglează sinteza de metabolizare a glucozei (figura 13.5). În ficat, în contrast față de mușchi, PP-1G este inhibată de fosforilaza a și astfel menține și fosforilaza în formă activă. De asemenea ea împiedică conversia glicogensintetazei la o formă mai activă, favorizând degradarea glicogenului. Inhibarea PP-1G de către fosforilaza a rezultă prin legarea fosforilazei a la subunitatea G a PP-1G. Inhibarea poate fi contracarată prin nivele crescute de glucoză, astfel glucoza legată la fosforilaza a face unitatea fosfoserină-14 mai accesibilă la acțiunea fosfatazei și fosforilaza b rezultată mai puțin activă, nu inhibă PP-1G. Astfel, glucoza tinde să activeze sinteza glicogenului. Adrenalina acționează PKA pentru fosforilarea PP-1G și astfel determină disocierea subunităților G și C. Aceasta inactivează fosfataza și glicogensintetaza, împiedicând conversia fosforilazei la formele mai puțin active.

Fig. 13.5. Metabolismul glucozei în ficat.

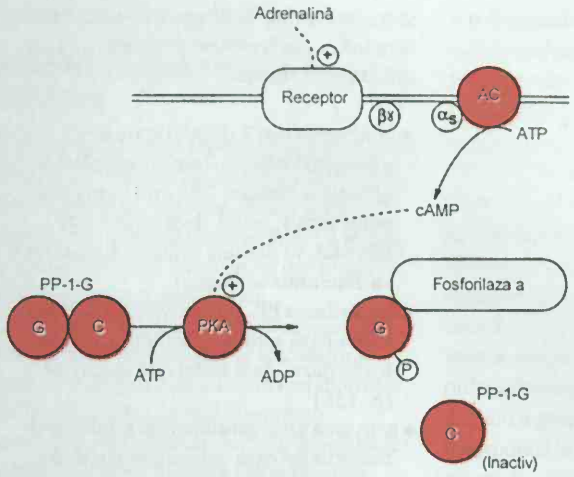


Fig. 13.6. Inactivarea PP-1G de către AMP ciclic.

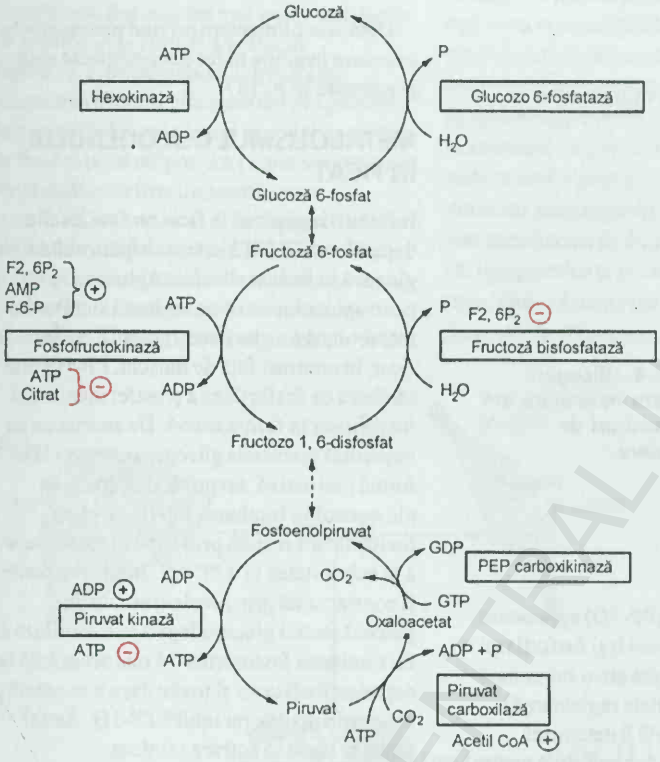


Fig. 13.7. Reglarea coordonată a glicolizei şi gluconeogenezei.

Acest mecanism demonstrează rolul adrenalinei în activarea degradării glicogenului (figura 13.6).

REGLAREA GLICOLIZEI ŞI A GLUCONEOGENEZEI

SCHEMA GENERALĂ A REGLĂRII GLICOLIZEI ŞI GLUCONEOGENEZEI

Figura 13.7 arată enzimele implicate în glicoliză şi gluconeogeneză. Căile de glicoliză şi gluconeogeneză utilizează enzime comune pentru anumite etape ale căii metabolice iar enzimele care au primit o atenţie specială pentru rolul lor reglator sunt cele specifice unei căi, cum sunt cele implicate în conversiile glucoză / glucozo-6-fosfat, fructozo-6-fosfat / fructozo-1,6-difosfat (Fru-6-P/Fru-1,6-P_2), fosfoenolpiruvat / piruvat.

GLUCOZĂ FOSFORILATĂ

Hexokinaza fosforilează glucoza şi alte hexoze şi are diferite izoforme cunoscute. Ficatul conţine patru hexokinaze (A-D sau I-IV, conform sistemului de nomenclatură detaliat în p. 89). După cum s-a explicat, glucokinaza este adaptată să răspundă modificărilor de glicemie faţă de nivelul fiziologic. Întrucât izoenzima predominantă se găseşte în ficat şi în celulele parenchimatoase, are rol major în metabolismul glucozei din ficat.

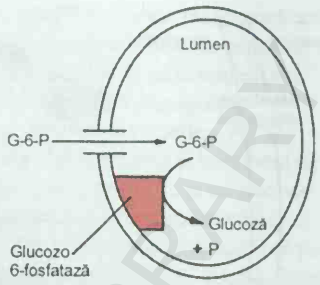


Fig. 13.8. Glucozo-6-fosfataza este localizată în lumenul reticulului endoplasmatic.

Glucozo-6-fosfataza este localizată în lumenul reticulului endoplasmatic şi astfel substratul său trebuie să fie transportat din citosol în lumen pentru a interacţiona cu enzima (fig. 13.8).

FRUCTOZO 2,6-DIFOSFAT

În ciclul Fru-6-P/F-1,6-P_2, analogul fructozo-2,6-difosfat are un rol important. El este format prin acţiunea 6-fosfofructo-2-kinazei, care în condiţii adecvate poate funcţiona şi ca o fructozo-2,6-difosfatază, aşa cum prezintă figura 13.9. Este o proteină cu masă de 49 kDa, care atunci când e fosforilată acţionează ca fosfatază şi când fosfatul este eliminat, acţionează ca şi kinază. Fructozo-2,6-difosfatul activează fosfofructo-1-kinaza şi acţionează ca reglator negativ al fructozo-2,6-difosfatazei. Acesta este considerat sistemul reglator major al ciclului Fru-6-P/Fru-1,6-P_2. În plus, sunt cunoscuţi şi alţi efectori alosterici pentru acţiunea lor în acest punct, în special asupra PFK. Aceştia include ca activatori AMP şi fosfatul iar ca inhibitori, ATP şi citratul. AMP inhibă fructozo-1,6-difosfataza.

INTERCONVERSIA PIRUVAT-FOSFOENOLPIRUVAT

Aşa cum s-a decis anterior, piruvat kinaza este enzima care catalizează conversia PEP (fosfoenolpiruvat) la piruvat în calea glicolitică, în timp ce în reacţia inversă din gluconeogeneză, este necesară acţiunea piruvatcarboxilazei şi a PEP carboxikinazei. Piruvat kinaza are în ficat activitate mult mai intensă decât piruvat carboxilaza şi PEP carboxikinaza. Este o enzimă alosterică care arată o cooperare homotropă faţă de substratul PEP şi este inhibată alosteric de ATP şi alanină. În plus, este activată de Fru-1,6-P_2. Este fosforilată atât de PKA cât şi de protein kinaza Ca^{2+}/calmodulin-dependentă (CAM-kinaza) aşa cum prezintă figura 13.10. Astfel, cei doi

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

mesageri secundari majori, cAMP și Ca^{2+}, determină fosforilarea, care inhibă această enzimă. Ambii compuși fosforilează o serină identică, în secvența LRRASVAQLTQE, treonina subliniată fiind de asemenea fosforilată de către CAM kinaza in vitro. PEP carboxikinaza nu se știe a fi reglată într-o cale fiziologică semnificativă de către efectori alosterici dar exprimarea sa genică a fost studiată detaliat referitor la reglarea pe termen lung a căii metabolice (vezi p. 166). Piruvat carboxilaza este activată de către acetil-CoA.

INFLUENȚA MORFOLOGIEI FICATULUI ASUPRA REGLĂRII

S-au dat multe exemple în capitole anterioare, privind modul în care compartimentarea enzimelor în organitele celulare contribuie la controlul metabolismului. Formarea complecșilor macromoleculari este o altă cale prin care organizarea fizică și structurală poate crea o astfel de influență. Ficatul oferă un exemplu privind importanța morfologiei în reglarea metabolismului, în care diferite grupuri de celule aparent identice – hepatocitele – arată nivele diferite de acțiune ale enzimelor tipice pentru metabolismul hepatocitelor, așa cum se explică mai jos. Nu este încă elucidat cum aceste diferențe sunt reflectate la nivel de transcriere, post-transcriere și post-traducere.

Țesutul hepatic este format din celule aranjate în lobuli. Lobulii sunt formați din celule ordonate așezate în jurul venei central-lobulare și au o formă aproximativ hexagonală așa cum se arată în figura 13.11. Periferia lor conține vase mici ale venei portale, care aduce sânge de la intestin. La centrul fiecărui lobul este un vas al venei centrale care preia sânge și îl elimină din ficat. Colorarea histochimică a activității enzimatice arată că multe enzime sunt distribuite în concentrații gradate prin lobul, ca de exemplu glutamin sintetaza și enzimele ciclului ureic, cele din urmă fiind localizate într-o largă zonă periportală care cuprinde mai mult decât 90% din hepatocite. Restul de 10% hepatocite, într-o zonă cu una-două rânduri de celule din jurul venei centrale, nu conțin enzimele ciclului ureic, dar au o concentrație mare de glutamin sintetază, care nu e prezentă în hepatocitele ce conțin enzimele ciclului ureic. O asemenea segregare a activității este neuzuală; enzimele aparținând altor sisteme complementare își suprapun efectele. S-a sugerat că glutamin sintetaza poate anihila orice rest de amoniac care poate rămâne din ciclul ureei, înainte de ieșirea metaboliților din lobulii hepatici.

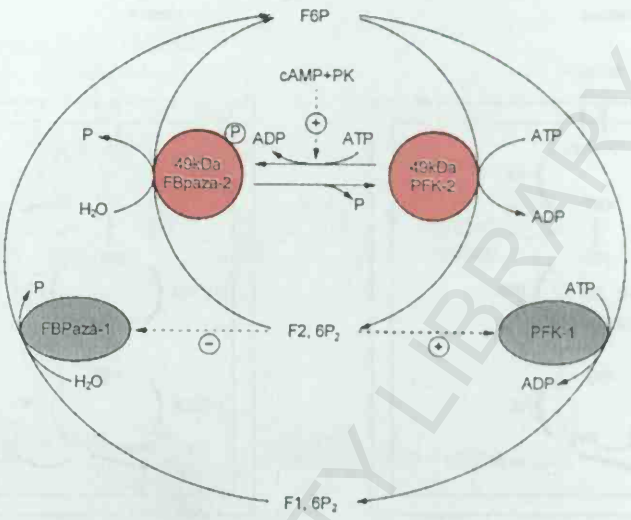


Fig. 13.9. Fosfofructokinaza-2 reglează nivelul concentrațiilor de fructozo-2,6 difosfat.

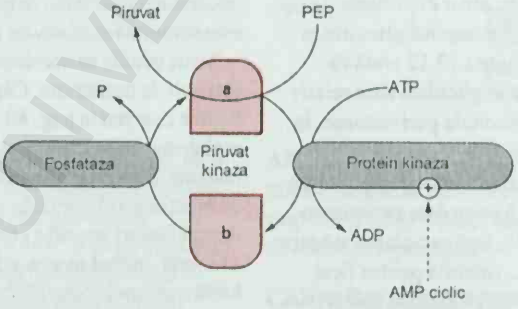


Fig. 13.10. Piruvat kinaza este reglată prin protein kinaza dependentă de AMP ciclic.

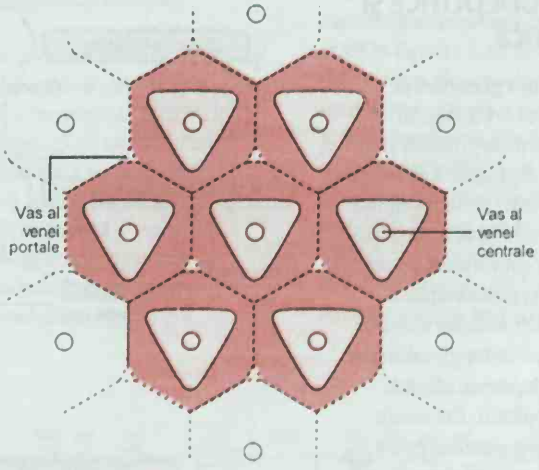


Fig. 13.11. Structura anatomică a lobulilor hepatici.

FACULTY OF MEDICINE CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

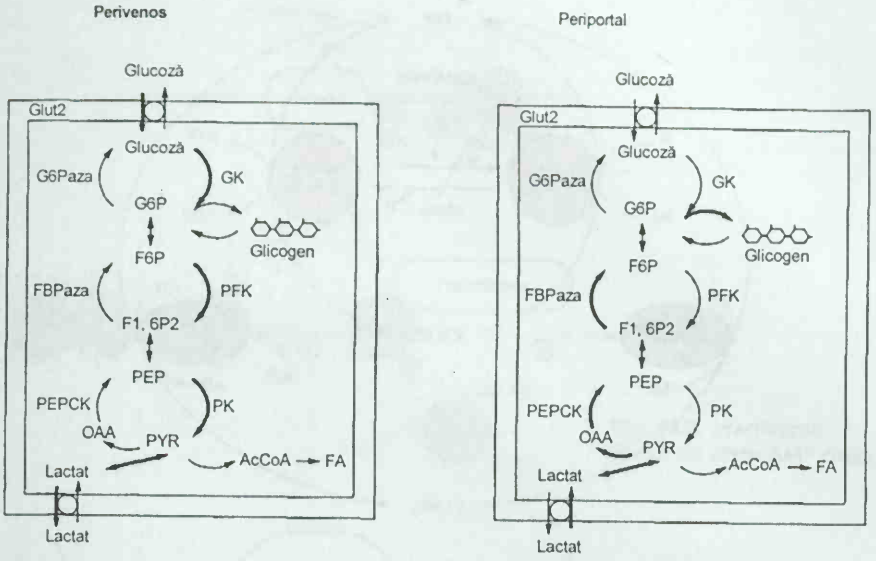


Fig. 13.12. Distribuția enzimelor glicolitice și gluconeogenetice în lobulii hepatici.

Un alt sistem care are o distribuție de tip gradient în hepatocite implică glicoliza și gluconeogeneza. Figura 13.12 arată că enzimele implicate în glicoliză sunt relativ îmbogățite în hepatocitele perivenoase. În hepatocitele periportale, enzimele gluconeogenetice sunt relativ îmbogățite, dar nu atât de pronunțat. Aceste date experimentale indică faptul că, deși reciclarea substratului este o noțiune valabilă pentru ficat luat ca întreg, se pare că aceasta este limitată la nivel de o celulă singulară, ca rezultat al specializării funcționale a hepatocitelor.

REGLAREA TRANSCRIERII GENELOR ENZIMELOR GLICOLITICE ȘI GLUCONEOGENETICE

Reglarea pe termen lung a glicolizei și gluconeogenezei implică schimbări în exprimarea genică și sinteza proteică și de asemenea în viteza de degradare a enzimei proteină. Aceste schimbări au fost studiate frecvent ca răspuns la schimbările nutriționale, dar hormoni precum insulina au rol important în creșterea și supraviețuirea celulelor și multe din acțiunile hormonilor asupra genelor specifice căilor glicolitice și gluconeogenetice sunt legate de efectele asupra creșterii și dezvoltării. Enzimele căilor glicolitice și gluconeogenetice care sunt reglate la nivel de transcriere sunt indicate în figura 13.13. Transcrierea enzimelor indicate în roz este inhibată de insulină și stimulată de AMP ciclic. În cazul enzimelor nemarcate colorat, transcrierea este stimulată de insulină și/sau glucoză și inhibată de AMP ciclic, cu excepția gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazei care este stimulată exclusiv de insulină.

Toate genele au secvențe care leagă factori generali de transcriere. Câțiva dintre aceștia au fost descriși la pag. 40. Alte secvențe reglatoare, cunoscute ca elemente de răspuns, leagă specific factori de transcriere ce funcționează numai în situații deosebite. Acești factori specific - tisulari pot, de exemplu, includ receptorii hormonali. O hartă a promotorului PEP carboxinazei este dată în figura 13.14 ca bază de ilustrare a tipului de reglare exercitat de procese metabolice asupra transcrierii genice.

Promotorul are un element de răspuns negativ față de insulină aflat la aproximativ -410 pb, care nu este dependent de glucoză, de exemplu insulina în sine este responsabilă de inhibarea transcrierii exercitate prin acest element de răspuns. S-a stabilit că genele metabolice reglate în aval („downregulated") de către insulină sunt pozitiv reglate de către glucagon și invers. Astfel, gena PEP carboxikinazei este activată de AMP ciclic prin intermediul elementului de răspuns CRE (vezi și p.190) la care proteina de legare a CRE (CREB) se leagă după fosforilarea mediată de PKA. Efectul CREB este dependent de legarea C/EBP la un element adițional (P_3) localizat la -240 pb. Alți factori din aceeași regiune denumiți „AMP-ciclic pozitivi" sunt reglatori pozitivi. Dimerul Fos/Jun este important în reglarea creșterii, așa cum s-a discutat în capitolul 16. Glucocorticoizii exercită o acțiune permisivă asupra activării genice prin glucagoni, de exemplu prezența complexului receptor/glucocorticoid/glucocorticoid legat la GRE este necesar pentru acțiunea glucagonului asupra transcrierii prin intermediul CREB.

CREB este parte a familiei factorilor de transcriere ce conțin proteine fermoar de leucină („leucine zipper") (vezi p. 41). Prin intermediul acestor proteine fermoar de leucină, CREB se va dimeriza cu el însuși sau cu ATF-1, Fos sau Jun. Tipul de interacțiune între factorii de transcriere, capacitatea dimerilor de a se lega la elementele CRE și gradul de fosforilare a factorilor individuali prin PKA, sunt factori care reglează transcrierea genelor specifice.

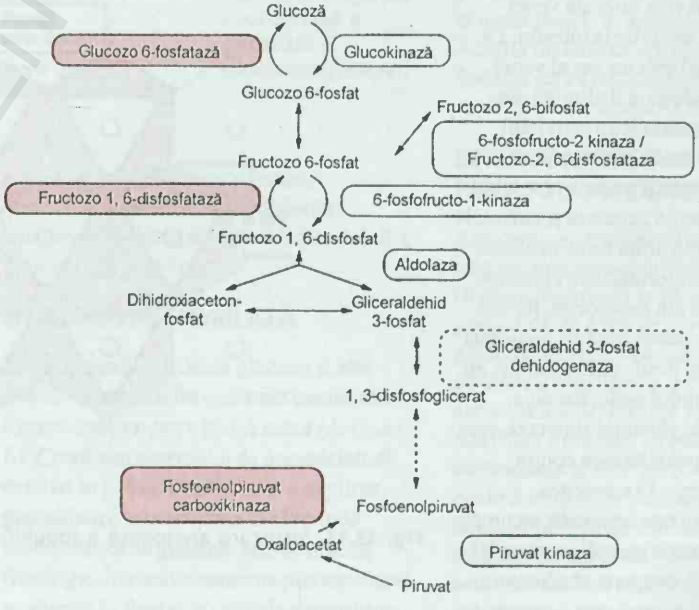


Fig. 13.13. Reglarea enzimelor glicolitice și gluconeogenetice la nivelul transcrierii.

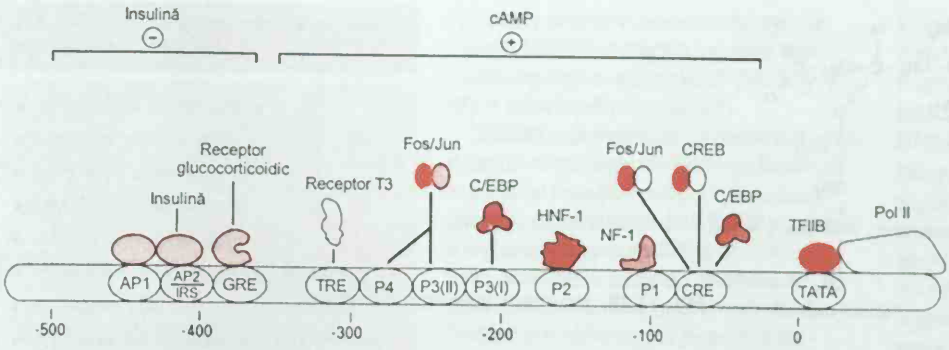


Fig. 13.14. Promotorul PEP al carboxikinazei.

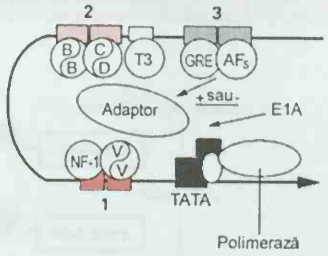


Fig.13.15. Aspecte structurale ale promotorului PEP carboxikinazei.

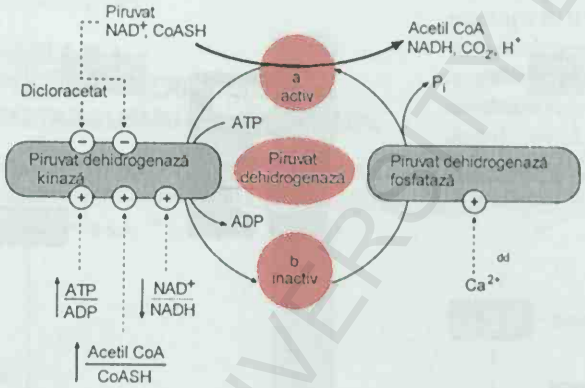


Fig. 13.16. Reglarea complexului piruvat dehidrogenazei.

Acțiunea secvențelor reglatoare controlată de la situsul de inițiere s-ar putea realiza prin plierea ADN astfel încât secvențele reglatoare se apropie de situsul de inițiere. Figura 13.15. ilustrează această situație în cazul PEP carboxikinazei. În figură, B reprezintă C/EBP, C reprezintă Jun, D reprezintă Fos și V reprezintă un situs care poate lega oricare dintre elementele C/EBP, Fos, Jun sau CREB. AF indică factorii accesorii AP1 și AP2.

REGLAREA METABOLISMULUI LIPIDIC

CONVERSIA PIRUVATULUI LA ACETIL CoA

Conversia piruvatului la acetil CoA este o etapă critică în metabolism întrucât, carbonul pierdut nu poate fi utilizat pentru biosinteza glucidelor dar e utilizabil în biosinteza lipidelor sau oxidat la CO_2 și apă. În acest fel, piruvat dehidrogenaza este o enzimă puternic reglată. Mecanismul principal de reglare implică acțiunea protein kinază/fosfatază, enzima fosforilată a cuplului fiind mai puțin activă decât nefosforilată. Această kinază nu este dependentă de AMP ciclic dar este specifică mitocondriilor și aparține unei familii unice independente de protein kinaze din citosolului sau membrană plasmatică. Sunt cunoscute două forme ale kinazei, una dintre ele fiind legată puternic subunitatea E_1 pe care o fosforilează. Așa cum este arătat în figura 13.16, kinaza este activată de raporturi înalte ATP/ADP și CoA/CoASH, de asemenea scăderea raportului NAD^+/NADH. Este inhibată de piruvat, astfel conversia la acetil CoA este stimulată când nivelul piruvatului crește. Protein fosfataza este activată de Ca^{2+}.

Dicloracetatul este folosit ca medicament care crește acidoza lactică. El inhibă kinaza, în consecință stimulează oxidarea piruvatului.

Genele care codifică diferite subunități ale complexului piruvat dehidrogenaziei sunt reglate de o varietate de factori de transcriere. Figura 13.17 arată regiunea promotor-reglatoare a subunității E1α umane. Aceasta relevă câteva secvențe („box") CAAT, împreună cu secvențele consens pentru diferite situsuri de transcriere cunoscute pentru legare/recunoaștere, incluzând legarea SP_1, legarea AP_2, elemente „fat"-specifice, elemente de răspuns la glucocorticoide și elemente de raspuns la AMP-ciclic. Secvența TATA este de asemenea prezentă.

CARNITINA ȘI FUNCȚIA SA

Acizii grași sunt transportați prin membrana mitocondrială internă sub formă de esteri ai carnitinei, un hidroxiacid cuaternar de amoniu. Carnitin acil esterii se formează într-o reacție reversibilă catalizată de enzima carnitin palmitoiltransferaza, așa cum se arată în figura 13.18. În mitocondrii există două forme ale acestei enzime, una în membrana externă, cunoscută ca CPT_1 și alta în membrana internă, numită CPT_2. În mitocondriile hepatice, CPT_1 are în principal funcția de conversie a esterilor acil-CoA în esteri acilcarnitinici, în timp ce CPT_2 e responsabil de formarea esterilor acil-CoA prin reacția CoA cu acilcarnitine, după ce acestea au fost transportate prin

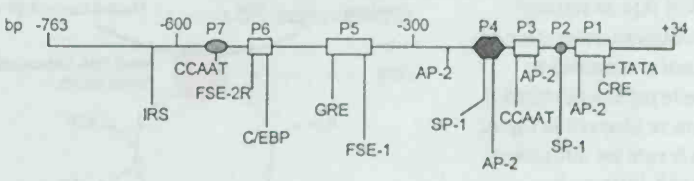


Fig. 13.17. Promotorul subunității E1a a complexului piruvat dehidrogenazei.

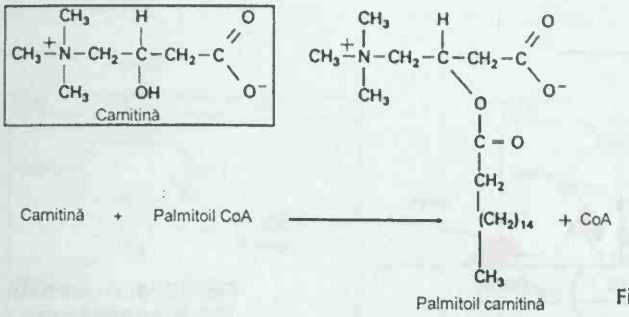


Fig. 13.18. Structura palmitoil carnitinei.

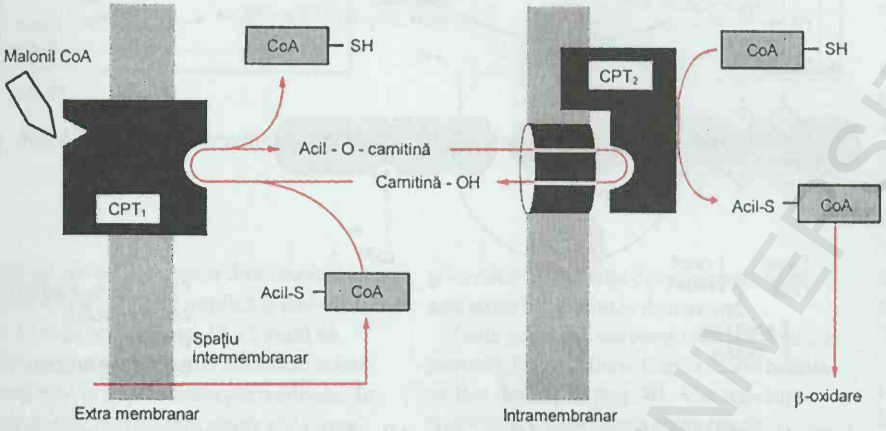


Fig. 13.19. Izoenzimele carnitin palmitoiltransferazei transportă grupări acil CoA în mitocondrii.

membrana internă de către „antiporter"-ul acilcarnitină:carnitină aşa cum este prezentat în figura 13.19. Esterii acil CoA formaţi în matricea mitocondrială sunt apoi metabolizaţi pe calea β-oxidării. CPT_1 joacă un rol important în reglarea metabolismului acizilor graşi. Este inhibat puternic de malonil CoA aşa încât atunci când nivelul malonil-CoA este mare (lipogeneza este activată) moleculele acil-CoA nu vor intra în mitocondrie pentru oxidare, dar vor fi reţinute în citosol pentru sinteza triacilglicerolului.

REGLAREA LIPOGENEZEI

Calea lipogenezei implică transportul acetil-CoA formată prin acţiunea piruvat dehidrogenazei, spre afara mitocondriei aşa cum este prezentat la p. 146. În citosol, acetil CoA este convertită la malonil CoA de către acetil CoA carboxilaza. Această enzimă este sensibilă faţă de statusul nutriţional, concentraţia sa descrescând la şobolani nealimentaţi şi crescând la re-alimentare. Ea este reglată de starea fosforilării, aşa cum se observă în figura 13.20. Malonil CoA este un inhibitor al CPT_1, astfel reducând intrarea în mitocondrie a grupărilor acil a acizilor graşi.

REGLAREA COORDONATĂ A METABOLISMULUI LIPIDIC ÎN FICAT

Aşa cum s-a explicat în capitolul 3, operonii nu sunt prezenţi la eucariote. Transcrierea grupurilor de gene cu funcţii apropiate poate fi controlată în mod coordonat de către elemente reglatoare. Un exemplu relevant este grupul de gene implicat în metabolismul lipidic din ficat, studiat detaliat în cazul sintezei VLDL. Transcrierea acestor gene este reglată ca răspuns la necesităţile ficatului de a sintetiza steroli şi regiunile promotor ale acestor gene conţin secvenţe reglatoare denumite elemente sterol-reglatoare (SRE). Proteinele care leagă SRE numite „SRE-binding proteins" (SREBP) acţionează ca factori asociaţi la transcriere. Tabelul 13.1 prezintă o listă de proteine cunoscute ca fiind sintetizate ca răspuns la acţiunea SREBP, acestea fiind implicate într-un larg spectru de funcţii metabolice ale lipidelor. Calea malonatului este implicată intens în acest sistem de reglare. Aceasta nu numai că dă naştere la produşi ce acţionează ca reglatori ai transcrierii, dar au efect la distanţă asupra funcţiilor celulei, prin legătura lor cu alte sisteme, aşa cum este ilustrat în figura 13.21. Aceste legături includ, de exemplu, farnesilarea proteinelor, cum ar fi în cazul produsului oncogenei *ras*. Această figură indică de asemenea acţiunea inhibitoare pe care această superactivitate a căii metabolice o are asupra sintezei receptorului LDL, a HMG CoA-reductazei şi a HMG-CoA-sintetazei. Această acţiune inhibitoare este exercitată prin SRE în regiunile 5' ale genelor. Figura 13.22 arată

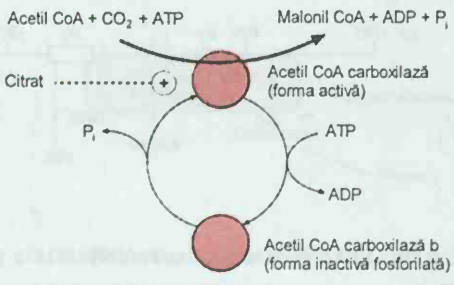


Fig. 13.20. Reglarea acetil CoA carboxilazei.

Tabelul 13.1. Proteine codate de gene de răspuns la SREBP

- Acetil-CoA carboxilaza
- Apo proteina B-100
- Acid gras sintetaze
- HMG-CoA reductază
- HMG-CoA sintetaza
- Izopentilfarnesildifosfat sintetază
- Receptor LDL
- Proteina de transfer microzomal al triglicerolului
- Squalen sintetază

detalii ale structurii promotorului a celor 3 gene. SREBP se leagă la secvențe care conțin repetiții a secvețelor 5'-PyCAPy-3' (Py = orice bază pirimidinică).

SREBP sunt sintetizate ca precursori ce au domenii ce traversează membrana localizate în reticulul endoplasmatic. Un domeniul citosolic este constituit din SREBP și conține o regiune de legare a ADN în formă de helix-buclă-helix-fermoar. Când celulele mamifere sunt nealimentate cu colesterol, SREBP este eliberat prin proteoliză din membrana reticulului endoplasmatic și intră în nucleu, unde activează transcrierea genelor ce codifică SRE.

REGLAREA POST-TRANSCRIPȚIONALĂ A METABOLISMULUI LIPOPROTEIC

De importanță egală sau mai mare decât reglarea transcrierii sunt și alte căi de reglare a cantității de proteine implicate în metabolismul lipidic. Aceste căi includ degradarea proteinelor, în special în cazul HMG-CoA reductazei și apo B-100. HMG-CoA reductaza este o proteină integrală a reticulului endoplasmatic și reglarea sa este legată, într-un mod încă neelucidat, de fluxul prin calea mevalonatului. Este posibil ca farnesil difosfatul să acționeze ca semnal de degradare. Când crește fluxul prin calea mevalonatului, se intensifică degradarea HMG-CoA reductazei, ca rezultat al activității proteazomilor (vezi p. 45). În cazul apo B-100, se știe că dacă lipsește una din lipidele necesare asamblării VLDL, apoproteina nu traversează eficient membrana reticulului endoplasmatic în timpul sintezei sale și este degradată cotranslațional, de exemplu, se degradează pe măsură ce se sintetizează.

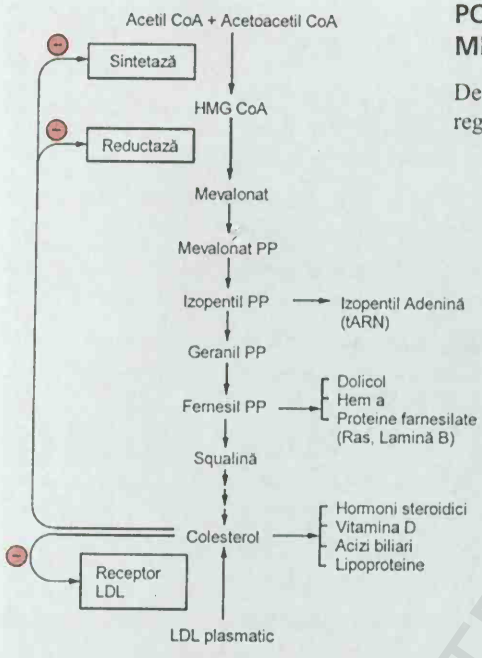


Fig. 13.21. Efectele căi metabolice mevalonat.

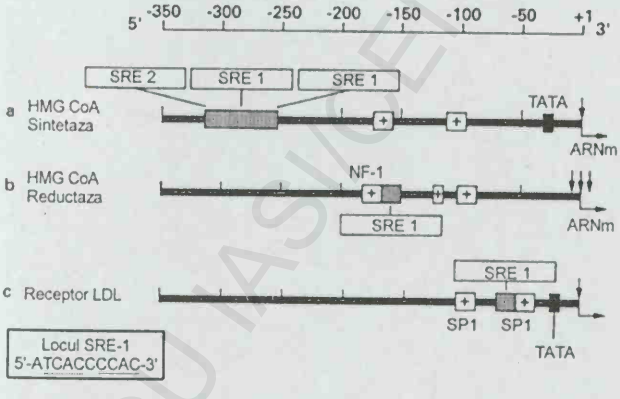


Fig. 13.22. Elemente de răspuns față de steroide aflate în genele HMG-CoA sintetazei, HMG-CoA reductazei și a receptorului LDL.

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Fosfolipide, alte lipide și glucide complexe

14

Lipidele şi glucidele complexe au un rol important, atât ca şi entităţi structurale cât şi ca modulatori activi ai activităţii metabolice. Glicerofosfolipidele sunt alcătuite dintr-o moleculă de glicerol esterificată cu unul sau doi acizi graşi şi o grupare fosfat, care la rândul ei este esterificată cu un compus cu azot sau inozitol. Există şi alţi derivaţi ai acestor compuşi. Sfingolipidele sunt derivaţi ai unui compus cu azot, sfingozina. Cele mai simple sfingolipide sunt ceramidele, în care la sfingozină se leagă cu un acid gras. Vitaminele liposolubile includ vitaminele A, D, E şi K. Prostaglandinele şi leucotrienele se formează din acizi graşi polinesaturaţi dintre care cel mai important este acidul arahidonic. Hormonii steroidici sunt biosintetizaţi pornind de la colesterol. Fosfolipidele sunt degradate prin hidroliză catalizată de către fosfolipaze.

Glucidele complexe constau în polimeri ai diferitelor monoglucide, inclusiv aminoglucide şi acid sialic. Grupările hidroxil sunt deseori sulfurilate. Aceste glucide complexe formează o parte a glicoproteinelor şi glicolipidelor, a căror biosinteză implică dolicil-fosfatul, pe care este construită catena glucidică înainte de a fi transferată pe proteină, în aparatul Golgi.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

FOSFOLIPIDE

STRUCTURA FOSFOLIPIDELOR

Structura fosfolipidelor are la bază unul dintre izomerii glicerol fosfatului. Denumirea atomilor de carbon depinde de un sistem de numerotare stereospecific, şi pentru a marca aceasta este utilizată abrevierea *sn*. În cadrul acestui sistem, glicerol-fosfatul implicat în biosinteza în metabolismul lipidelor este denumit *sn*-glicerol-3-fosfat. Astfel, atomii de carbon C-1 şi respectiv C-2 sunt frecvent notaţi ca *sn*-1 şi *sn*-2 (a se vedea fig. 14.1).

În fosfolipide, la grupările hidroxil de la C-1 şi C-2 se leagă esteric resturi de acizi graşi, iar gruparea hidroxil de la C-3 este esterificată cu acid fosforic. Această grupare fosforică este frecvent esterificată cu o altă grupare, care poate fi, fie inozitolul, fie unul dintre cei trei compuşi cu azot: colina, serina sau etanolamina (fig. 14.2). Gruparea fosfat împreună cu compusul cu azot (sau cu inozitolul) poartă numele de grupare-cap („head group"). În fosfatidilglicerol, compusul cu azot este înlocuit de către glicerol, esterificat la gruparea fosfat prin una dintre grupările sale alcool primar. Fosfolipide importante în mitocondrii sunt cardiolipidele, în care două molecule de acid fosfatidic sunt legate între ele printr-o moleculă de glicerol, fiecare dintre grupările fosfat fiind esterificată cu una dintre grupările alcool primar ale glicerolului.

Cea mai simplă fosfolipidă nu conţine grupări cu azot sau alte grupări ataşate la gruparea fosforică. Aceasta este diacil-sn-glicerol-3-fosfat, adică *sn*-glicerol-3-fosfat esterificat cu resturi de acizi graşi la C-1 şi C-2. Denumirea sa

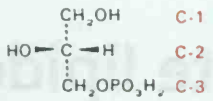


Fig. 14.1. Numerotarea *sn* a glicerol-3-fosfatului.

comună este acid fosfatidic şi derivaţii săi sunt astfel fosfatidilesteri. De aceea esterul cu colină al acidului fosfatidic este cunoscut sub numele de fosfatidilcolină.

Fosfolipidele pot avea un număr de acizi graşi diferiţi esterificaţi la C-1 şi C-2. Astfel, sunt posibili mai mulţi izomeri pentru fiecare fosfolipidă, fiecare izomer fiind denumit ca o specie de fosfolipidă. 1-Palmitoil-2-linoleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolină şi 1-stearoil-2-arahidonoil-*sn*-glicero-fosfocolină sunt două specii de fosfatidilcolină. Acizii graşi polinesaturaţi tind să ocupe poziţia C-2 iar acizii graşi saturaţi – poziţia C-1. Fosfatidilserinele, fosfatidiletanolaminele şi fosfatidilinozitolii pot fi denumiţi în mod similar dacă se cunosc acizii graşi constituenţi.

BIOSINTEZA FOSFOLIPIDELOR

Biosinteza fosfolipidelor începe cu reacţia prin care două molecule de acil CoA sunt utilizate pentru a acila o moleculă de glicerol-3-fosfat, formând acidul fosfatidic, la fel ca în biosinteza triacilglicerolilor. În transformările ulterioare sunt implicaţi intermediari ce conţin o nucleotidă ca grupare activatoare. În fig. 14.3 este prezentată structura unei astfel de molecule, citidin difosfocolina, şi este indicată calea prin care se formează aceasta în reacţia dintre fosfocolină şi CTP. Alte molecule de acest fel sunt citidin difosfoetanolamina şi citidin difosfodiacilglicerol. În fiecare caz structura este analoagă, cu o legătură esterică între gruparea fosfat terminală a CDP şi gruparea hidroxil a etanolaminei, respectiv a diacilglicerolului. Reacţiile prin care se formează diferite fosfolipide sunt schiţate în fig. 14.4.

FOSFOLIPAZE

Fosfolipidele sunt degradate de către fosfolipaze, enzime care hidrolizează una sau alta dintre legăturile stabilite între diferite componente ale moleculei de fosfolipidă. Astfel, aşa cum este prezentat în fig. 14.5 pentru fosfatidilcolină, fosfolipaza A_1 hidrolizează legătura esterică de la C-1 iar fosfolipaza A_2 hidrolizează legătura esterică de la C-2. Dacă este îndepărtat doar unul dintre resturile de acizi graşi, compusul rezultat poartă numele lizo-glicerofosfolipidă (de exemplu lizofosfatidiletanolamină). Fosfolipazele B îndepărtează restul de acid gras de pe o lizo-glicerofosfolipidă. Fosfolipazele C scindează legătura dintre diacilglicerol şi gruparea-cap. Astfel, din fosfatidilcolină se formează diacilglicerolul şi fosfocolina. Fosfolipazele D hidrolizează legătura fosfatidil- eliberând acid fosfatidic şi gruparea cu azot. Fosfolipaza A_2 are o semnificaţie specială în membrana celulară, deoarece acidul gras pe care îl eliberează de la C-2 poate fi un acid gras polinesaturat, frecvent acidul arahidonic. Intradevăr, unele dintre aceste enzime manifestă specificitate pentru fosfolipide ce conţin grupări arahidonoil la C-2, şi astfel eliberează substrate pentru biosinteza prostaglandinelor şi leucotrienelor.

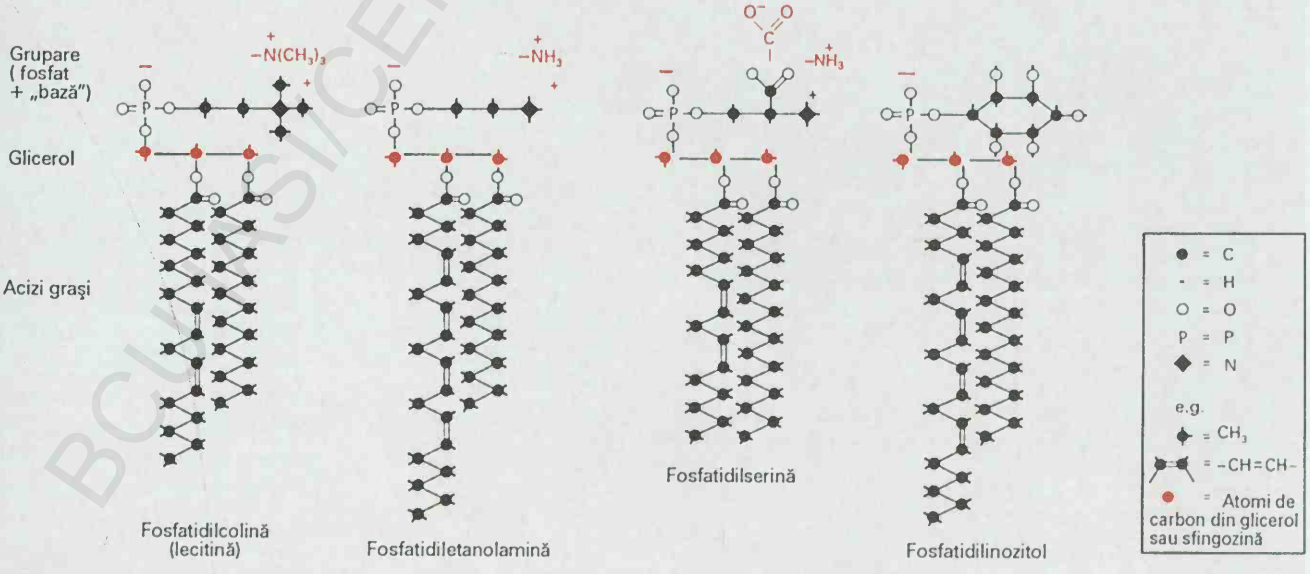


Fig. 14.2. Structura glicerofosfolipidelor.

FOSFOLIPIDE CE CONŢIN INOZITOL

Fosfolipidele ce conţin inozitol, cunoscute sub numele general de inozitofosfatide, au primit recent o atenţie sporită, datorită rolului lor in semnalizarea celulară (a se vedea Capitolul 15). Aşa cum se poate observa în fig. 14. 6., cel mai simplu reprezentant este fosfatidilinozitolul (PtdIns). Acesta poate fi fosforilat succesiv la poziţiile 4 şi 5 a nucleului de inozitol, formând fosfatidilinozitol-4-fosfat (PtdInsP) şi fosfatidilinozitol-4,5-difosfate ($PtdInsP_2$). Fosfolipazele C specifice pentru inozitofosfatide sunt importante, aşa cum s-a explicat în Capitolul 15, prin eliberarea diacilglicerolului şi a derivaţilor fosforilaţi ai inozitolului, care funcţionează în semnalizarea celulară. În cazul $PtdInsP_2$, se eliberează inozito-1,4,5-trifosfat ($InsP_3$). Acest tip de enzimă poartă numele de fosfodiesterază, deoarece ea atacă diesteri ai acidului fosforic, adică acid fosforic care are implicate în legături esterice două dintre grupările hidroxil –OH acide.

SFINGOLIPIDE

Sfingolipidele au la bază un aminoalcool numit sfingozină. La gruparea amino a sfingozinei se leagă amidic un rest de acid gras. Gruparea hidroxil terminală se leagă glicozidic la o oză sau la o catenă oligoglucidică, cu excepţia sfingomielinei, unde se leagă printr-o legătură esterică la gruparea fosfat a unui rest de fosfocolină. Structurile câtorva sfingolipide sunt prezentate în fig. 14. 7. Gangliozidele formează un grup important de sfingolipide (a se vedea p. 181). Sfingomielinele sunt deasemenea denumite corect şi fosfolipide, deoarece ele conţin fosfor. Cerebrozidele şi gangliozidele nu conţin fosfor, dar conţin

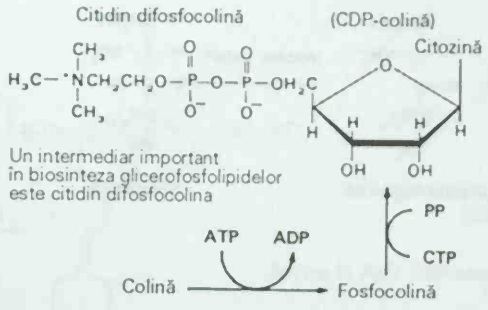


Fig. 14.3. Biosinteza CDP-colinei.

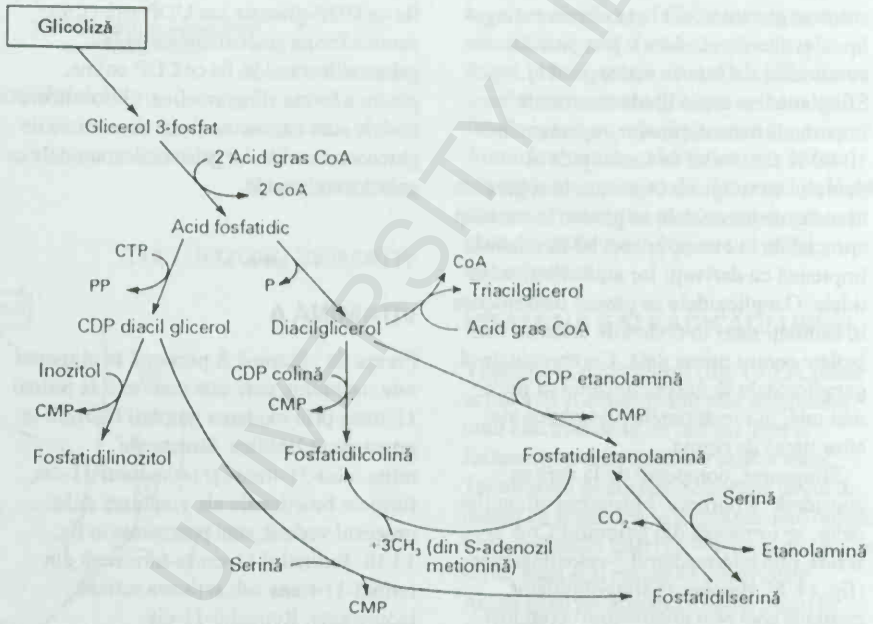


Fig. 14.4. Biosinteza fosfolipidelor.

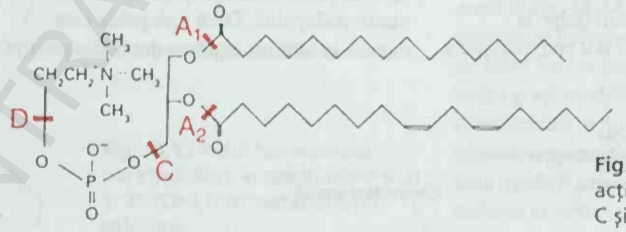


Fig. 14.5. Poziţiile în care acţionează fosfolipazele A, C şi D.

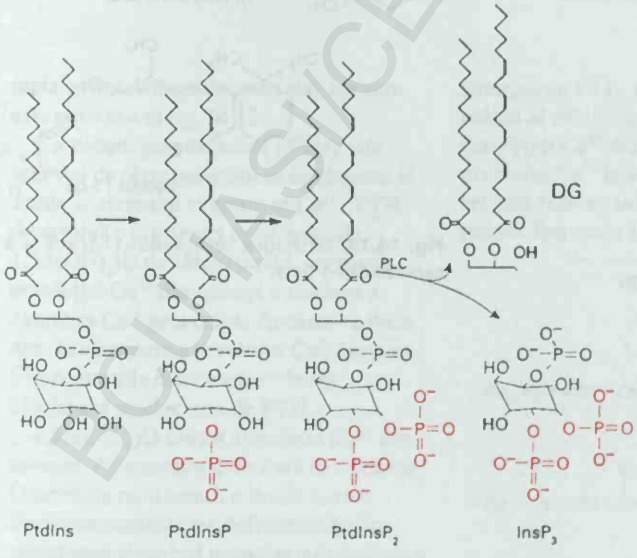


Fig. 14.6. Fosfatidilinozitolii.

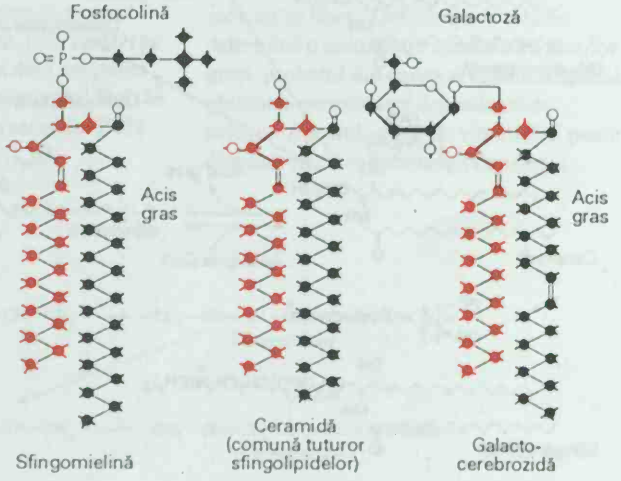


Fig. 14.7. Structurile sfingolipidelor.

BUCHAREST CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

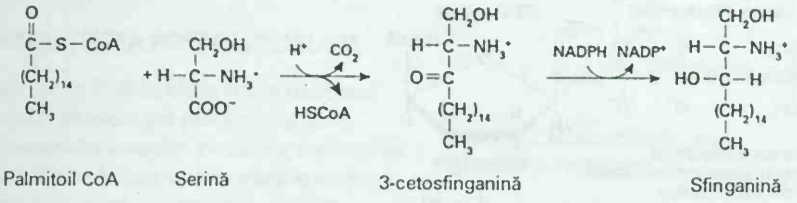


Fig. 14.8. Biosinteza sfinganinei din palmitoil CoA şi serină.

structuri glucidice, deci ambele sunt sfingolipide şi glicolipide. Unele gangliozide conţin acid sialic (a se vedea p. 181). Sfingomielina este o lipidă structurală importantă a membranelor, reprezentând 10-20 % din totalul de fosfolipide al dublului strat lipidic. Aşa cum le sugerează numele, cerebrozidele se găsesc în cantităţi apreciabile în creier, în special în mielină, împreună cu derivaţii lor sulfurilaţi, sulfatidele. Gangliozidele se găsesc deasemenea în cantităţi mari în creier, de unde au fost izolate pentru prima dată. Cerebrozidele şi gangliozidele se găsesc în cantităţi mult mai mici în membranele plasmatice ale altor tipuri de celule.

Sfinganina, compusul de la care se consideră că porneşte biosinteza sfingolipidelor, se formează din palmitoil CoA şi serină, prin intermediarul 3-cetosfinganinei (fig. 14. 8). Biosinteza sfingolipidelor continuă apoi prin intermediul ceramidei (fig. 14. 9). Aceasta se formează prin acilarea grupării amino a sfinganinei, urmată de introducerea unei legături duble la carbonul C-4. Ceramidele pot apoi reacţiona fie cu UDP-glucoza sau UDP-galactoza, pentu a forma glucozilceramide sau galactozilceramide, fie cu CDP-colina, pentru a forma sfingomieline. Glucozilceramidele sunt cunoscute şi sub denumirea de glucocerebrozide, iar galactozilceramidele ca galactocerebrozide.

VITAMINE LIPOSOLUBILE

VITAMINA A

Forma de vitamină A prezentă în alimente este retinolul, care este convertit la retinal 11-trans prin oxidarea grupării hidroxil la gruparea aldehidică. Structurile retinalului-11-trans- şi retinalului-11-cis, formele funcţionale ale vitaminei A în procesul vederii, sunt prezentate în fig. 14.10. Retinalul 11-cis se formează din retinal-11-trans sub acţiunea retinal izomerazei. Retinalul-11-cis interacţionează cu o proteină, numită opsină, pentru a forma pigmentul vizual numit rodopsină. Dacă rodopsina este expusă la lumină, legătura dublă din poziţia C-11 a retinalului-cis izomerizează la trans, cauzând disocierea rodopsinei la opsină şi retinal-trans, care este convertit din nou la forma cis, de către retinal izomerază.
Cel puţin trei funcţii fiziologice distincte sunt dependente de aportul nutriţional adecvat de vitamină A:

1. Funcţia somatică, incluzând creşterea şi diferenţierea structurilor epiteliale şi oaselor, de exemplu.
2. Reproducerea, incluzând spermatogeneza, ovogeneza, dezvoltarea placentei şi creşterea embrionului.
3. Procesele vizuale, în special vederea la întuneric.

Dozele excesive de vitamină A sunt foarte toxice, şi se pot dovedi fatale. Se crede că administrarea prelungită de vitamină A poate fi teratogenă, adică poate cauza anomalii fetale. Acesta este un factor de risc pentru femeile însărcinate, deoarece vitamina A şi derivaţii săi sunt un tratament eficient al acneei.

VITAMINA D

Forma principală a vitaminei D este colecalciferolul, care se formează sub acţiunea radiaţiilor ultraviolete, din 7-dehidrocolesterol, un derivat al colesterolului depozitat în piele. Colecalciferolul (fig. 14.11) este convertit în ficat în 25-hidroxicalciferol, care este mai departe convertit în rinichi, la forma activă a vitaminei – 1,25-dihidroxicolecalciferol (1,25$(OH)_2$)D). Vitamina D este implicată, împreună cu hormonul paratiroidian şi cu calcitonina, în

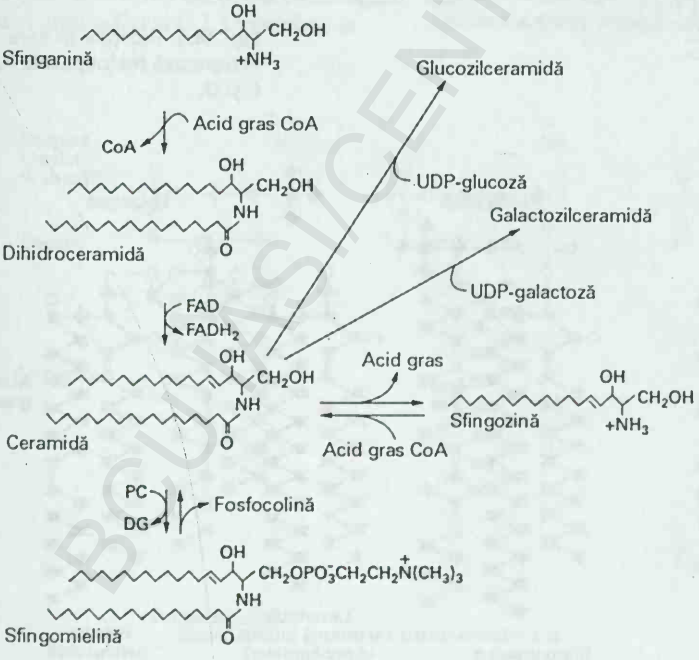


Fig. 14.9. Biosinteza ceramidei, sfingomielinei şi a sfingozinei.

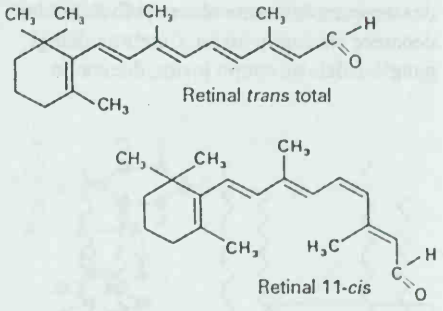


Fig. 14.10. Structura retinalului-11-trans şi a retinalului-11-cis.

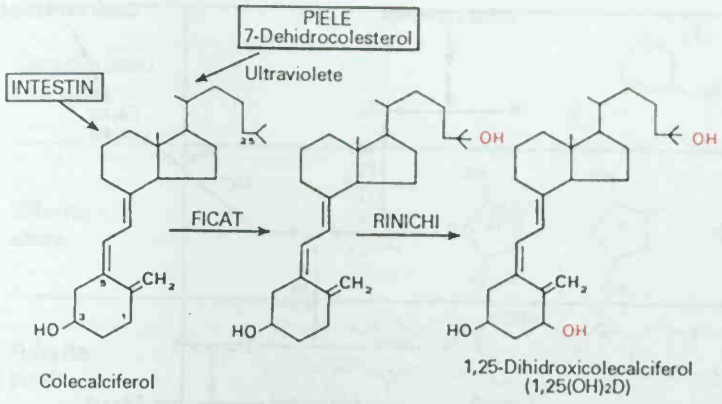


Fig. 14.11. Biosinteza 1, 25 – dihidroxicolecalciferolului.

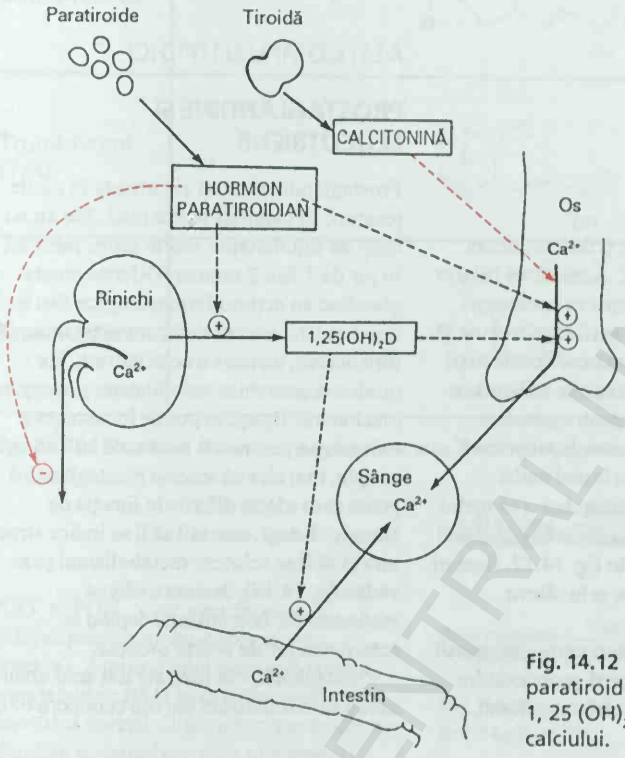


Fig. 14.12 Rolul hormonului paratiroidian, al calcitoninei şi al 1, 25 $(OH)_2D$ în metabolismul calciului.

reglarea metabolismului calciului, aşa cum este prezentat în fig. 14.12.

Hormonul paratiroidian (PTH) este secretat de către paratiroidă ca răspuns al scăderii nivelului sanguin al Ca^{2+}. PTH determină o creştere a producerii de $1,25(OH)_2D$ de către rinichi, creşterea resorbţiei Ca^{2+} din oase şi o scădere a excreţiei Ca^{2+} prin urină. Aceasta va duce deci la o creştere a nivelului Ca^{2+} sanguin. Concentraţiile mari ale Ca^{2+} în ser blochează producerea de PTH.

$1,25(OH)_2D$ creşte absorbţia Ca^{2+} din intestin. Alimentaţia deficitară în vitamină D produce rahitismul, o boală în care formarea oaselor este defectuoasă, din cauza unei absorbţii intestinale deficitare a Ca^{2+}. $1,25(OH)_2D$ acţionează deasemenea sinergic cu PTH, ca răspuns la nivelul scăzut al calciului sanguin, prin creşterea resorbţiei Ca^{2+} din oase şi deci creşterea nivelului Ca^{2+} în ser. Când nivelul Ca^{2+} în ser este ridicat, inhibarea secreţiei PTH reduce formarea $1,25(OH)_2D$.

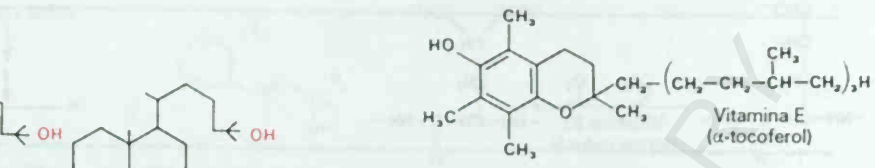


Fig. 14.13. Structura α-tocoferolului (vitamina E).

Calcitonina este produsă de către celulele C ale tiroidei. Ea este secretată ca răspuns la un nivel ridicat al Ca^{2+} în ser şi inhibă resorbţia osoasă. La pacienţii cu boala Paget, atât resorbţia osoasă cât şi formarea oaselor este excesivă, formarea oaselor fiind cuplată cu resorbţia osoasă. Administrarea de calcitonină este foarte eficentă în această boală, deoarece, pe lângă inhibarea resorbţiei ososase, calcitonina are şi un efect inhibitor asupra activităţii osteoclastelor.

VITAMINA E ŞI RADICALII LIBERI

Vitamina E, α-tocoferol (fig. 14.13), poate acţiona ca şi antioxidant, prin acceptarea unui electron de la un radical liber şi formarea unui intermediar relativ stabil. Tocoferolul poate deci întrerupe lanţul de reacţii ce se produc la formarea unui radical liber. Radicalii liberi provin de la mai multe surse, cum ar fi radiaţiile ultraviolete. Acizii graşi polinesaturaţi esterificaţi în fosfolipidele din membrane, sunt susceptibili la atacul radicalilor, aşa cum se arată în fig. 14.14. Fosfolipidele rezultate, conţinând hidroperoxizi, sunt recunoscute de către fosfolipaze, care hidrolizează acizii graşi modificaţi. Aceştia sunt transformaţi în hidroxiacizi de către glutation peroxidază (a se vedea p. 131), care poate fi apoi oxidată de către alte sisteme enzimatice. O dietă bogată în acizi graşi polinesaturaţi trebuie însoţită de suplimente de vitamină E, din cauza posibilităţilor crescute de formare a radicalilor liberi. Deficienţa de seleniu determină o peroxidare accelerată a acizilor graşi, probabil din cauza nivelului scăzut al glutation-peroxidazei dependentă de seleniu. Aportul sporit de vitamină E poate diminua efectele deficienţei de seleniu.

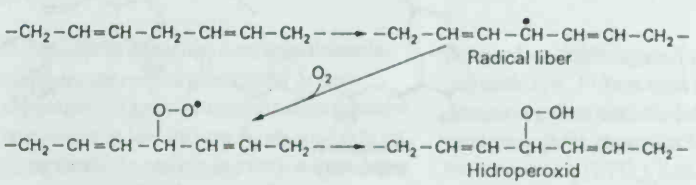


Fig. 14.14. Formarea radicalilor liberi şi a hidroperoxizilor.

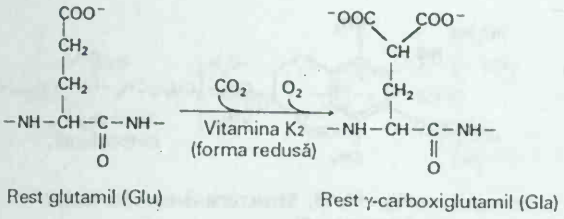


Fig. 14.15. Formarea resturilor γ-carboxiglutamil.

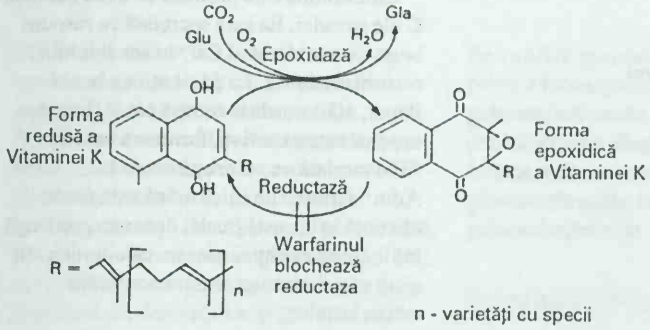


Fig. 14.16. Formarea epoxidului vitaminei K.

VITAMINA K

Vitamina K_2, menachinona, este esențială pentru coagularea normală a sângelui. Vitamina K este un cofactor în formarea post-translațională a resturilor γ-carboxiglutamil în anumite proteine, inclusiv protrombina (fig. 14.15.). Dacă, ca rezultat al deficienței de vitamină K, protrombina nu poate fi carboxilată, mecanismul de coagulare al sângelui funcționează imperfect. Când vitamina K ia parte la carboxilarea resturilor de acid glutamic la resturi γ-carboxiglutamil, ea este oxidată la forma epoxidică. Această formă este în mod normal redusă din nou la vitamina K de către o reductază. Warfarina inhibă această reductază, și deci mimează deficiența de vitamină K. Aceasta stă la baza utilizării clinice a warfarinei ca anticoagulant. Nivelul în sânge al warfarinei trebuie să fie atent monitorizată, deoarece dozele mari sunt foarte toxice. De aceea este utilizată ca o otravă foarte eficientă pentru șobolani.

Carboxilarea, dependentă de vitamina K, a resturilor glutamil are loc la mai multe proteine din cascada de coagulare a sângelui. Proteinele care conțin resturi carboxiglutamil sunt prezentate cu roșu în fig. 14.17. Resturi carboxiglutamil se găsesc și în câteva proteine din țesuturi.

Proteinele ce conțin resturi carboxiglutamil leagă puternic Ca^{2+} datorită proprietăților chelatoare ale restului γ-carboxiglutamil.

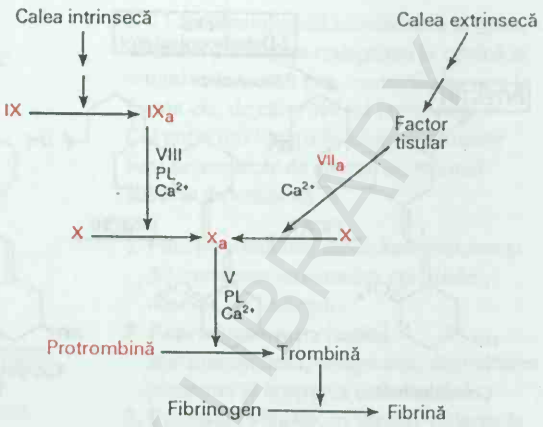


Fig. 14.17. Proteine ale cascadei de coagulare a sângelui ce conțin resturi γ-carboxiglutamil.

ALȚI COMPUȘI LIPIDICI

PROSTAGLANDINE ȘI LEUCOTRIENE

Prostaglandinele sunt sintetizate în multe țesuturi, în cantități foarte mici. Ele au un timp de înjumătățire foarte scurt, frecvent în jur de 1 sau 2 minute. Diferite prostaglandine au acțiuni farmacologice foarte importante, care cuprind contracția musculaturii netede, inclusiv a celei uterine. Ele produc deasemenea vasodilatație și agregare plachetară. Totuși, acțiunile lor sunt prea numeroase pentru a fi rezumate într-un mod simplu, mai ales că aceeași prostaglandină poate avea efecte diferite în funcție de situație. Totuși, este util să li se indice structura și să li se schițeze metabolismul (a se vedea fig. 14.18), deoarece câteva medicamente larg utilizate depind în activitatea lor de aceste procese.

Prostaglandinele formate din acid arahidonic sunt sintetizate din doi endoperoxizi,

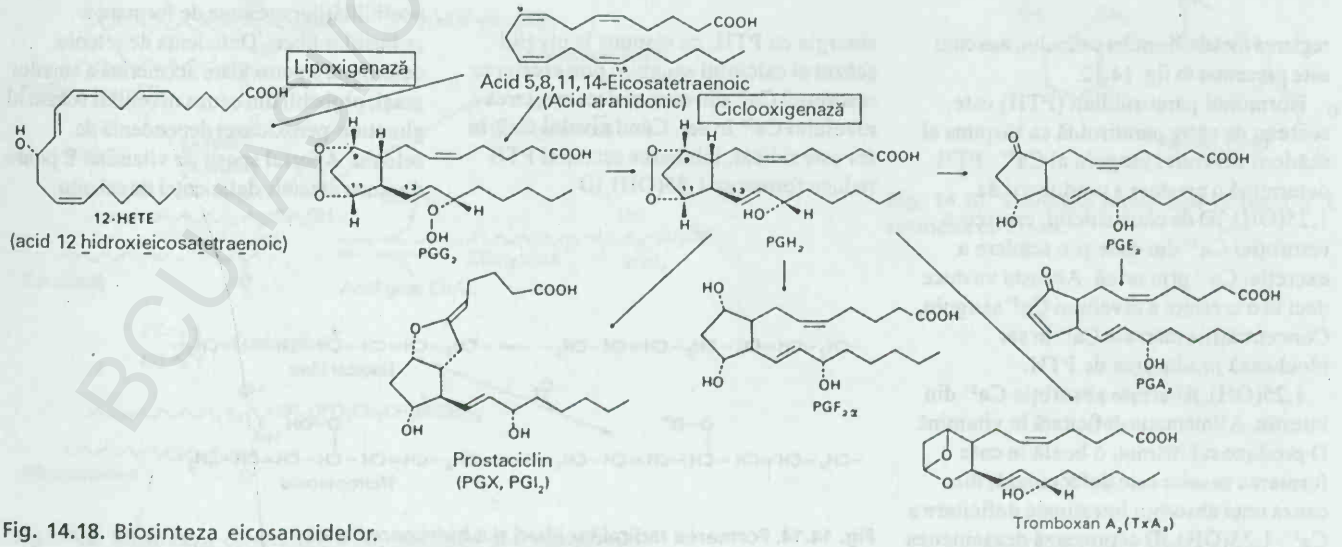


Fig. 14.18. Biosinteza eicosanoidelor.

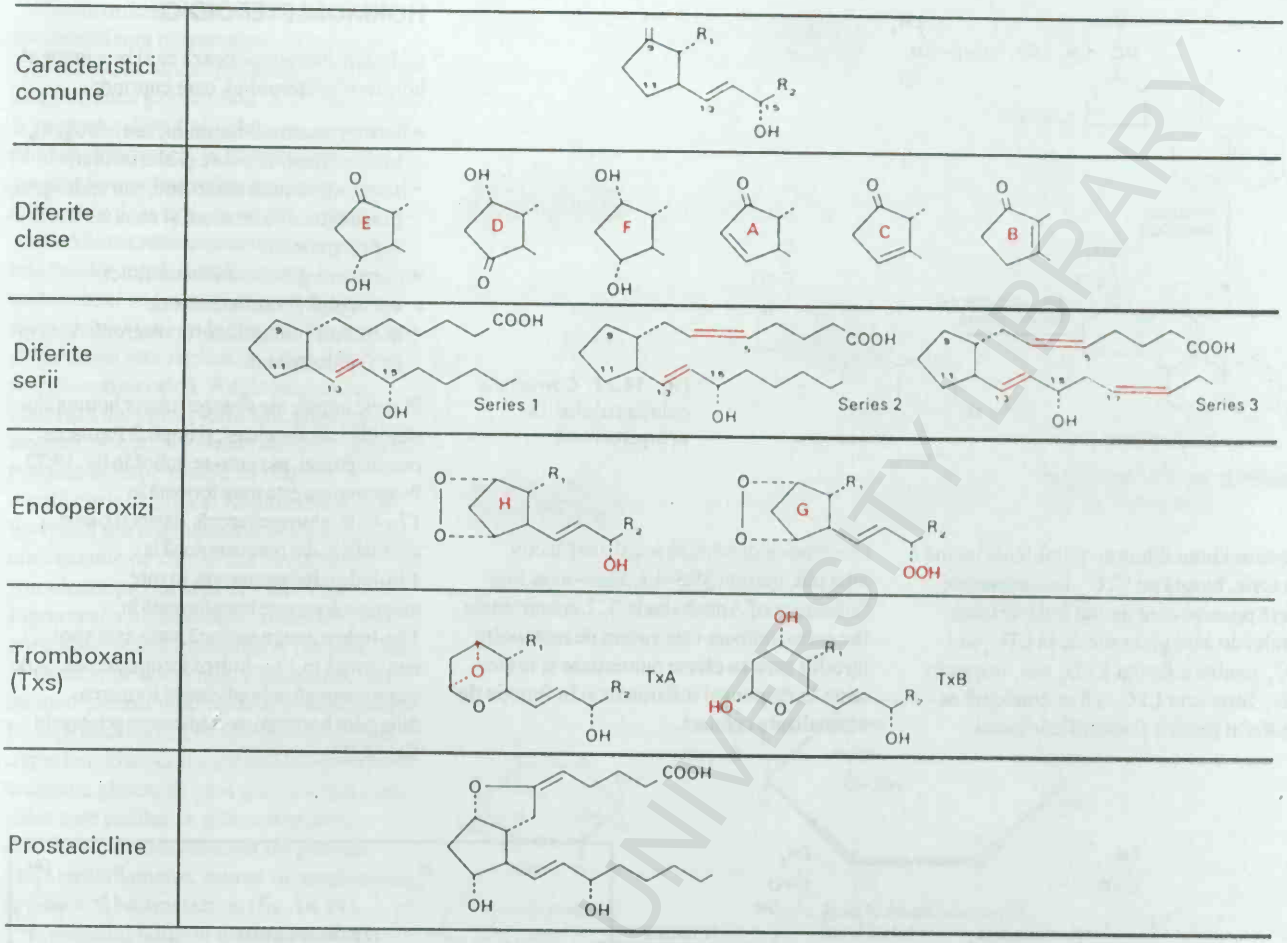


Fig. 14.19. Structura unor prostaglandine și a unor compuși înrudiți.

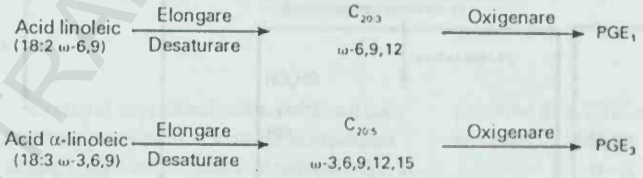


Fig. 14.20. Acidul linoleic și acidul α-linolenic sunt precursori ai diferitelor familii de prostaglandine.

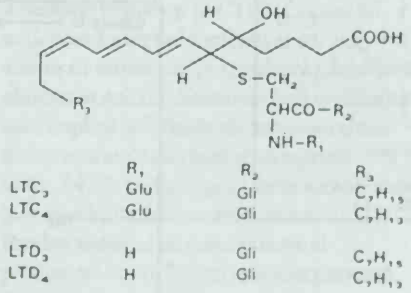


Fig. 14.21. Structura leucotrienelor.

PGG_2 și PGH_2, care sunt produși ai enzimei prostaglandin-endoperoxid sintetază. Aspirina inhibă această enzimă, proprietate ce stă la baza acțiunii sale împotriva durerii. Diferitele clase de prostaglandine se deosebesc prin substituenți și prin natura structurii nucleului, așa cum se arată în fig. 14.19. În funcție de substratul asupra căruia acționează prostaglandin-endoperoxid sintetaza, se pot forma prostaglandine din diferite serii. Dacă se pornește de la acid dihomo-γ-linolenic, se formează seria '1' de prostaglandine, iar dacă se pornește de la acid α-linolenic, se formează seria '3' de prostaglandine. Cele mai des întâlnite sunt prostaglandinele din seria '2', formate din acid arahidonic.

Alte enzime, cunoscute sub numele de lipoxigenaze, acționează asupra acidului arahidonic și formează derivați hidroxilați ai acizilor grași polinesaturați, cu activitate farmacologică. Unul dintre acești compuși este acidul 12-hidroxieicosatetraenoic (HETE), care este implicat în răspunsul inflamator ca agent chemotactic și determină celula să se deplaseze în gradient chimic.

O importanță deosebită o au leucotrienele, care sunt derivați ai produsului 5-lipoxigenazei. 5-Lipoxigenaza transformă acidul arahidonic în leucotriena A_4, un acid gras cu 20 de atomi de carbon în care s-a introdus o grupare epoxidică în poziția 5,6. Leucotriena A_4 are o structură caracteristică de trienă cu duble legături conjugate în pozițiile 7, 9, 11 (așa cum se indică în denumire). Gruparea tiolică a glutationului poate reacționa la poziția 6, formând leucotriena C_4 (LTC_4), a cărei structură este prezentată în fig. 14.21. Leucotrienele care se formează prin acțiunea 5-lipoxigenazei

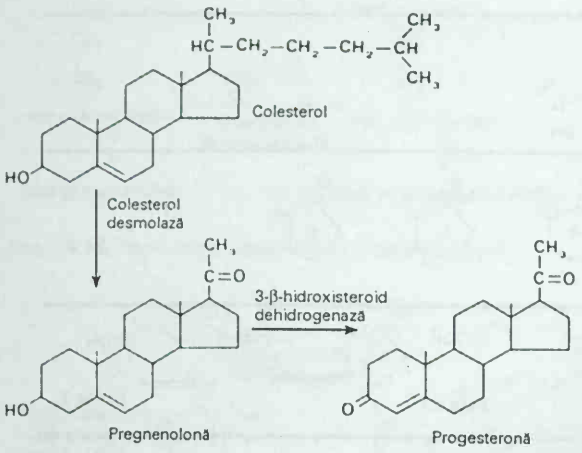


Fig. 14.22. Conversia colesterolului la progesteronă.

HORMONI STEROIDICI

Colesterolul funcţionează ca şi precursor al hormonilor steroidici, care cuprind:

- hormonii sexuali feminini, sau estrogeni, biosintetizaţi în ovare şi alte ţesuturi
- hormonii sexuali masculini, sau androgeni, biosintetizaţi în testicul şi zona corticală a suprarenalelor
- hormonii glucocorticosteroidici, cortizolul şi corticosterona
- hormonii mineralocorticosteroidici, cum ar fi aldosterona

Etapele iniţiale ale sintezei tuturor hormonilor steroidici sunt aceleaşi, şi implică formarea progesteronei, aşa cum se indică în fig. 14.22. Progesterona este transformată în 17α-hidroxiprogesteronă. Există şi o cale alternativă, din pregnenolonă la 17α-hidroxiprogesteronă, în care pregnenolona este transformată în 17α-hidroxipregnenolonă, care este apoi convertită în 17α-hidroxiprogesteronă. Alte etape enzimatice implicate în formarea diferiţilor hormoni steroidici sunt schiţate în fig. 14.23.

asupra acidului dihomo-γ-linolenic includ o altă serie, bazată pe LTC_3. Leucotrienele suferă procese care includ îndepărtarea restului de acid glutamic de la LTC_4 sau LTC_3, pentru a forma LTD_4 sau, respectiv LTD_3. Structura LTC_3 a fost elucidată ca rezultat al izolării şi identificării unei subsanţe ce determină socul anafilactiv întârziat, numită SRS-A („Slow-Reacting Substance of Anaphylaxis"). Leucotrienele fac parte dintr-un vast sistem de metaboliţi înrudiţi care au efecte numeroase şi importante în răspunsul inflamator şi în funcţia de semnalizare celulară.

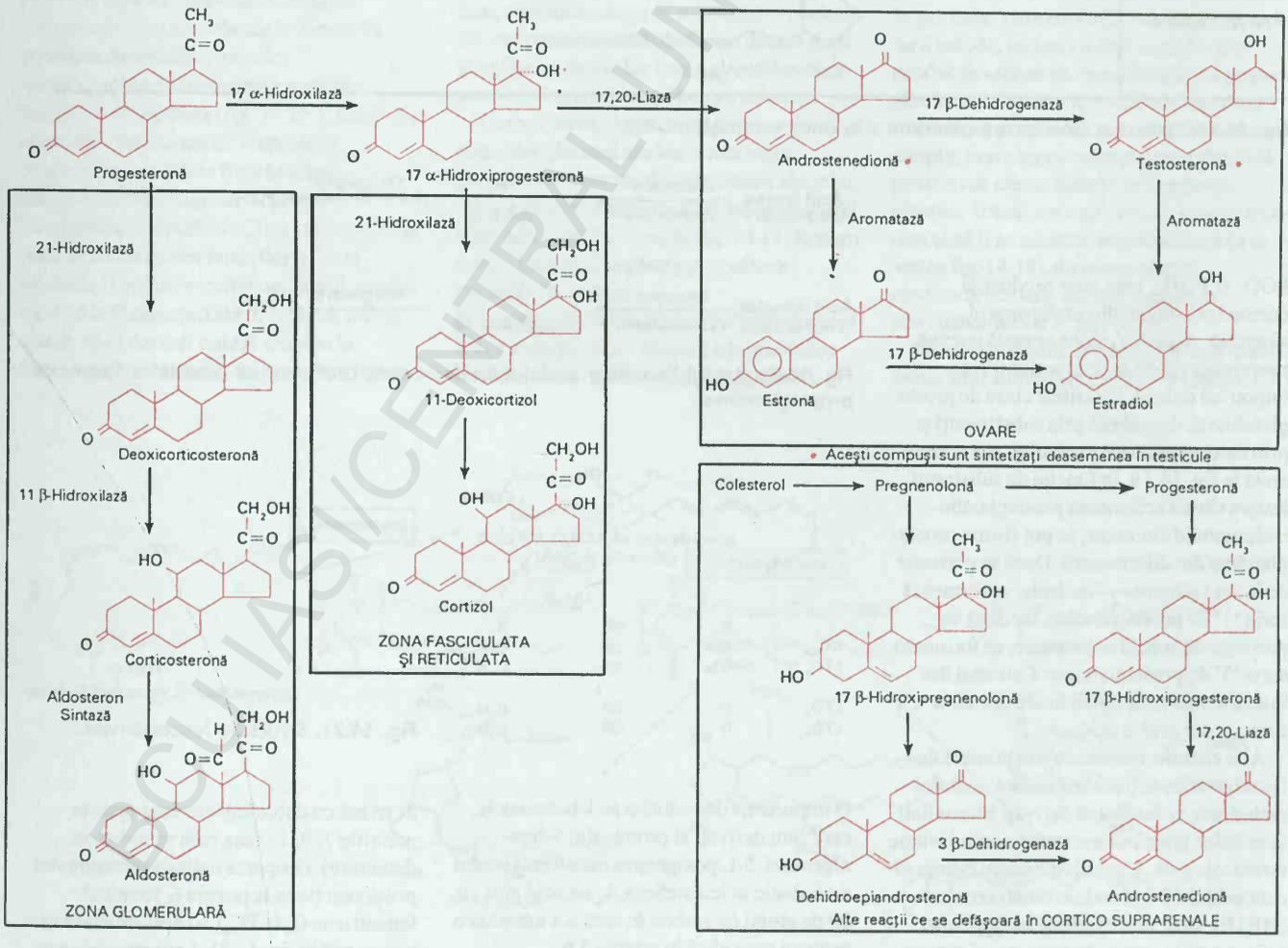


Fig. 14.23. Căi de biosinteză a hormonilor steroidici.

Glucocorticosteroizii și mineralocorticosteroizii sunt biosintetizați în cortexul suprarenal, în care se pot distinge trei zone de țesut: zona glomerulata, zona fasciculata și zona reticulata. Celulele zonei glomerulare produc aldosterona, în timp ce celulele zonelor fasciculata/reticulata produc mai ales cortizol (la om), și puțină corticosteronă. Aldosterona acționează asupra celulele tubilor renali distali, în sensul creșterii reabsorbției sodiului și al creșterii excreției de potasiu și ioni de hidrogen. Secreția de aldosteronă este reglată de către sistemul renină-angiotensină. Angiotensina I se formează din precursorul său, angiotensinogen, prin acțiunea unei enzime – renina – produsă de către rinichi ca răspuns la modificările osmotice. Angiotensina II se formează din angiotensina I sub acțiunea unei enzime de conversie. Angiotensina II stimulează producerea de către cortexul suprarenal a aldosteronei, amândoi compușii având efect hipertensiv. Un inhibitor al enzimei de conversie, captoprilul, este un medicament mult utilizat pentru controlul hipertensiunii. Cortizolul este cel mai important glucocorticosteroid și determină creșterea glicemiei, prin promovarea reacțiilor care conduc la gluconeogeneză. Cortizolul are deasemenea un puternic efect antiinflamator, mimat de medicamente cum ar fi betametazona (fig. 14.24).

Principalul hormon androgen, testosteronul, este produs de către celulele Leydig din testicule. Hormonii androgeni sunt responsabili pentru dezvoltarea, menținerea și funcționarea organelor reproducătoare masculine și al caracterelor sexuale secundare, cum ar abilitatea de a forma și elibera sperma, îngroșarea vocii masculului și modul de distribuție al părului. Androgenii au efect anabolic puternic, determinând creșterea masei osoase și musculare, efect care este exploatat în agricultură și uneori (ilegal) ce către atleți.

Estrogenii, împreună cu progesterona, sunt produși de către foliculii de Graaf din ovare. Ei sunt responsabili pentru dezvoltarea, menținerea și funcționarea organelor reproducătoare, ciclurile activității sexuale și caracterele sexuale secundare la femele.

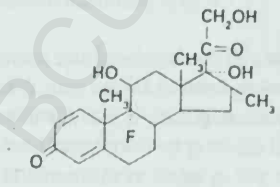


Fig. 14.24. Structura betametazonei.

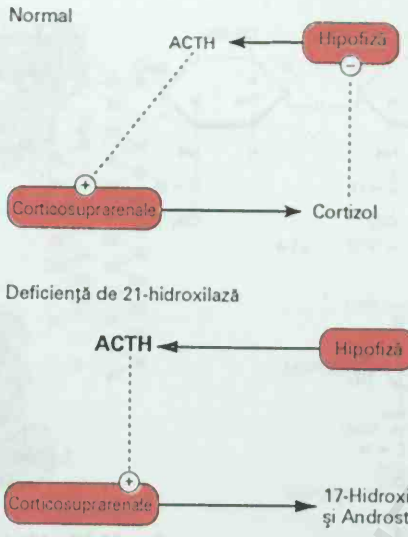


Fig. 14.25. Efectul deficienței de 21-hidroxilază.

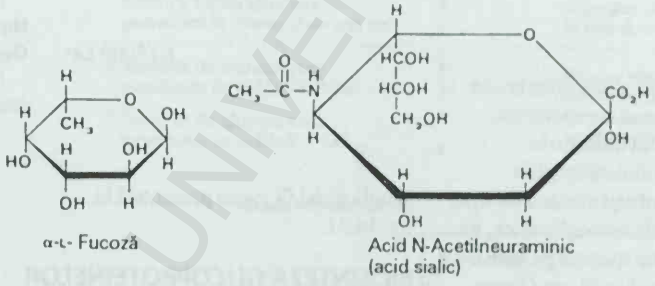


Fig. 14.26. Structura α-L-fucozei și a acidului sialic.

Cortexul suprarenal este un alt țesut care produce precursori ai sintezei hormonilor sexuali, cum ar fi dehidroepiandrosterona și androstendiona. Amândoi acești compuși sunt androgenici.

Biosinteza cortizolului este stimulată de către un hormon hipofizar, hormonul adrenocorticoptrop (ACTH). Cortizolul acționează asupra hipofizei, printr-un sistem de retroinhibiție (feedback), inhibând eliberarea ACTH. Se cunosc boli ereditare care implică deficiențe ale uneia sau alteia dintre enzimele căii biosintetice prezentată în fig. 14.23. Deficiența 21-hidroxilazei duce la imposibilitatea sintezei cortizolului și, ca rezultat sistemul de retroinhibiție al producerii de ACTH nu mai funcționează, ducând la producerea exagerată a acestui hormon. Boala asociată cu această deficiență enzimatică este cunoscută ca hiperplazia congenitală a suprarenalelor. În cazul deficienței 21-hidroxilazei, nu este împiedicată numai producerea de cortizol și aldosteronă, ci are loc și o sinteză excesivă de 17α-hidroxiprogesteronă și androstendionă, datorită concentrațiilor excesive de ACTH ce ajung la suprarenalele afectate (fig. 14.25).

GLUCIDE COMPLEXE

STRUCTURA GLUCIDELOR COMPLEXE

Termenul de glucide complexe este utilizat pentru a denumi oligoglucide și poliglucide ce conțin o gamă largă de oze frecvent esterificate cu grupări sulfat și incluzând și aminoglucide. S-a făcut deja referire la câteva poliglucide aparținând acestei clase, la p. 102. Poliglucidele complexe formează componenta glucidică a glicoproteinelor și se găsesc deasemenea și în glicolipidele ce conțin ceramide. Aceste glicolipide pot determina un alt mecanism de legare a unor componente glucidice ce se găsesc pe suprafața externă a celulei, la membrana plasmatică. În catenele glucidelor complexe se găsesc două oze care nu au fost descrise anterior, fucoza și acidul sialic, fig. 14. 26.

În afara legăturilor α1-4 glicozidice, comune poliglucidelor de rezervă, glucidele

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

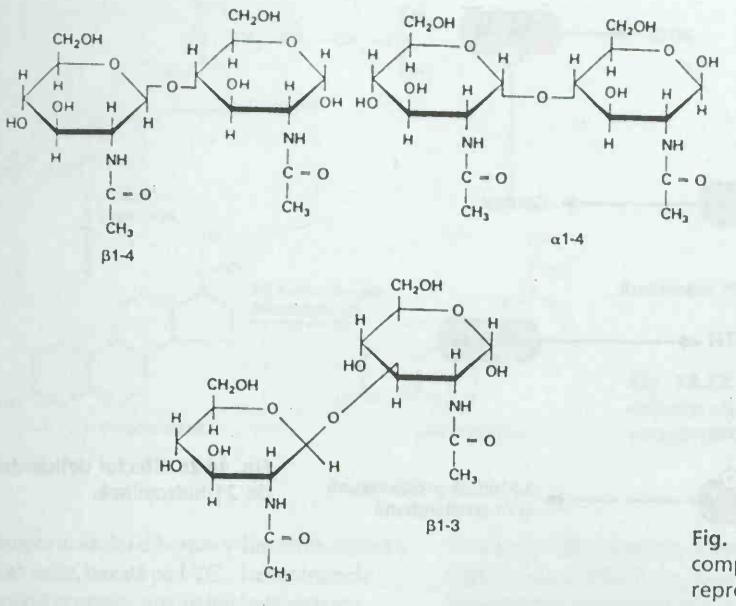


Fig. 14.27. Legături β1-4, β1-3 și α1-4 glicozidice.

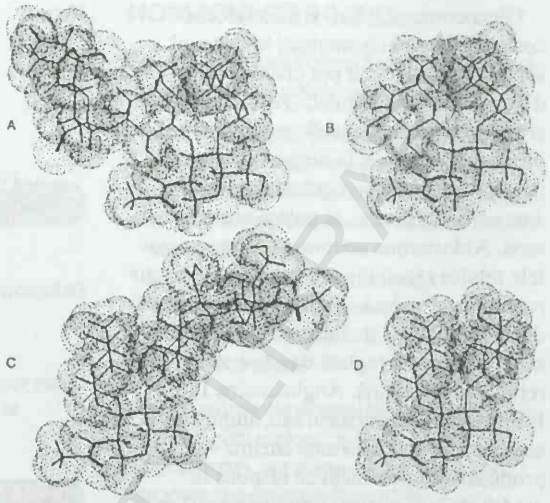


Fig. 14.28. Modificări relativ minore în structura glucidelor complexe influențează semnificativ forma moleculei. Structura reprezintă capătul nereducător al antigenilor din sistemul Lewis al grupelor sanguine, după cum urmează:
(a) Sialil Le^a Galβ1-3GlcNacβ1- (b) Le^a Galβ1-3GlcNacβ1-
| 2,3 | 1,4 | 1,4
NeuAcα Fucα Fucα
(c) Sialil Le^x Galβ1-4GlcNacβ1- (d) Le^x Galβ1-4GlcNacβ1-
| 2,3 | 1,3 | 1,3
NeuAcα Fucα Fucα

complexe conțin legături glicozidice la alte grupări hidroxil ale ozelor componente, unele dintre acestea fiind ilustrate în fig. 14.27. Structura tridimensională a poliglucidelor va fi profund afectată de tipul de legătură între unitățile monoglucidice, de aceea numărul de forme spațiale pe care îl poate avea chiar și o triglucidă, este foarte mare. Fig. 14.28 arată schimbările substanțiale în forma tridimensională care sunt cauzate de schimbări relativ minore ale structurii. Aceste exemple sunt substanțele de grup sanguin ale sistemului Lewis. Datorită numeroaselor forme pe care le pot adopta, aceste substanțe au un rol fiziologic ideal conceput, pentru a funcționa ca și molecule de recunoaștere.

Atașarea unei catene glucidice la proteine se face fie la gruparea hidroxil a unui rest de serină sau treonină, cunoscute ca și catene legate O-glicozidic (fig. 14.29), fie la gruparea amidică a unui de rest de asparagină, cunoscute ca și catene legate N-glicozidic (fig. 14.30). Legătura glicoproteică ilustrată în fig. 14.29 este întâlnită în structura mucinei, al cărei nume provine de la faptul că a fost izolată pentru prima dată din secreția celulelor mucoase (de exemplu saliva). Acest exemplu reprezintă una dintre substanțele de grup sanguin, în care activitatea antigenică e datorată componentei glucidice. Ea se găsește atât sub formă de glicoproteină cât și sub formă de glicolipidă. Gangliozidele formează un grup important de glicolipide cu acid sialic, răspândite în creier, unde reprezintă circa 6 % din fracțiunea lipidică. Cantități mici de gangliozide se găsesc și pe suprafața multor altor celule. Structura gangliozidei G_{M1} este prezentată în fig. 14.31.

BIOSINTEZA GLICOPROTEINELOR ȘI GLICOLIPIDELOR

Biosinteza poliglucidelor complexe utilizează o moleculă lipidică, dolicil fosfat (fig. 14.32), format prin acțiunea dolicol kinazei. La acestă moleculă se adaugă succesiv diferite unități monoglucidice, fie derivate din oze componente ale nucleotidelor, fie dolicil difosfoglucide. Într-o sinteză tipică, UDP-N-acetilglucozamina reacționează cu dolicil fosfat pentru a forma dolicil difosfo-N-acetilglucozamină și UMP, una dintre grupările fosfat ale UDP fiind transferate la N-acetilglucozamină. La gruparea hidroxil din C-4 a N-acetilglucozaminei se adaugă mai departe o altă moleculă de N-acetilglucozamină, provenind din UDP-N-acetilglucozamină, pentru a forma GlcNAc(β1-4)GlcNAc-difosfodolicol. Ulterior se adaugă cinci resturi de manoză,

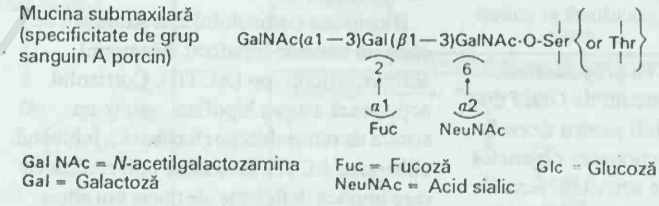


Fig. 14.29. Structura mucinei submaxilare cu specificitate de grup sanguin A.

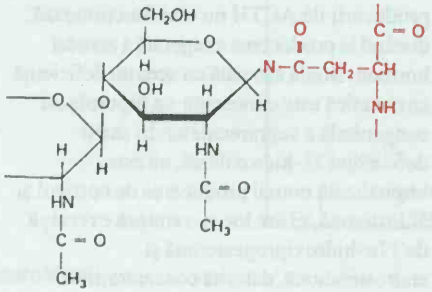
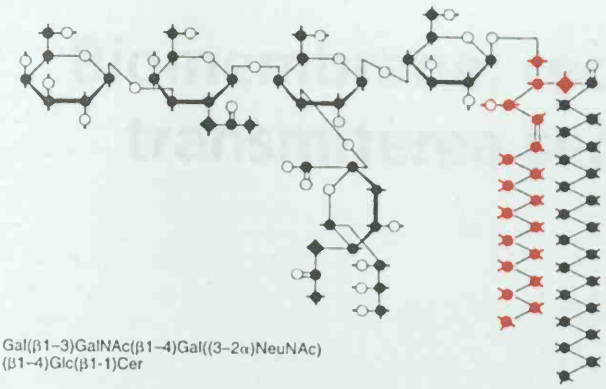


Fig. 14.30. Oligoglucidele legate N-glicozidic sunt atașate unui rest de asparagină din proteină.



Gangliozida G_{M1}

Fig. 14.31. Structura gangliozidei G_{M1}. Pentru sensul simbolurilor, a se vedea p. 172. Cer = ceramidă.

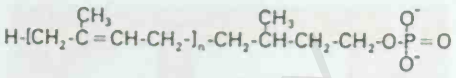


Fig. 14.32. Structura dolicil fosfatului.

printr-o reacție ce utilizează GDP-manoza ca substrat, pentru a forma structura ramificată prezentată în fig. 14.33. Toate aceste reacții au loc în reticulul endoplasmic, cu catena oligloglucidică în creștere spre citoplasmă. Dolicil difosfoglucida este apoi inversată prin membrană, astfel încât oligoglucida iese în lumen. Sunt apoi adăugate patru unități de manoză, utilizând dolicil difosfomanoza, și apoi trei resturi de glucoză, utilizând dolicil difosfoglucoza ca substrat.

După formarea ei, catena oligoglucidică ce conține 14 resturi glucidice, este transferată la un rest de asparagină al unei catene polipeptidice care se sintetizează într-un ribozom aflat în vecinătatea dolicil difosfo-oligoglucidei (fig. 14.34). Deoarece catena polipeptidică în formare trece în aparatul Golgi, catena glucidică poate suferi modificări ulterioare (a se vedea p. 43).

O enzimă cheie în modificarea catenei glucidice în aparatul Golgi este N-acetil-glucozamin galactozil transferaza. Această enzimă universal răspândită, se găsește în multe tipuri de celule, legată la membrana aparatului Golgi, constituind un marker enzimatic pentru această organită (a se vedea p. 43). Ea adaugă galactoză, prin legături β-(1→4), la restul glucidic terminal al ambelor regiuni centrale („core") ale ramurilor oligoglucidice.

UDP-galactoză + N-Acetilglucozamină → N-Acetillactozamină + UDP

Lactoza este biosintetizată de către lactoz sintetază, care constă în două proteine, A și B. Proteina A este N-acetilglucozamin galactozil transferaza iar proteina B este α-lactalbumina (a se vedea p. 59), o proteină a laptelui. Proteina B modifică specificitatea de substrat a proteinei A, de la N-acetilglucozamină la glucoză, deci:

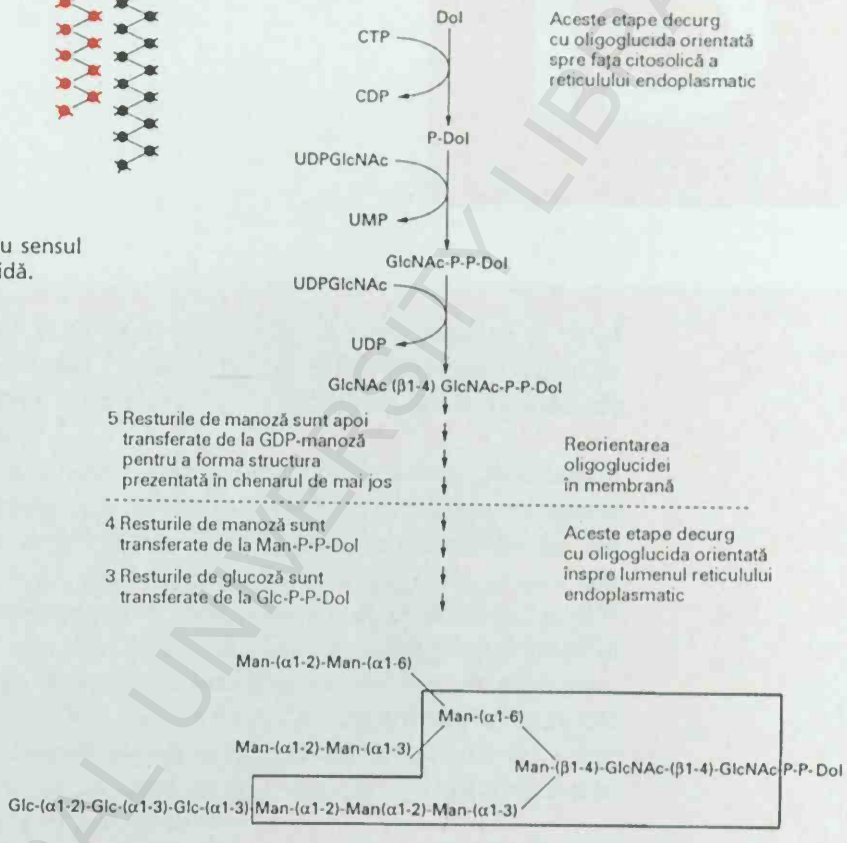


Fig. 14.33. Calea biosintetică a dolicil oligoglucidelor.

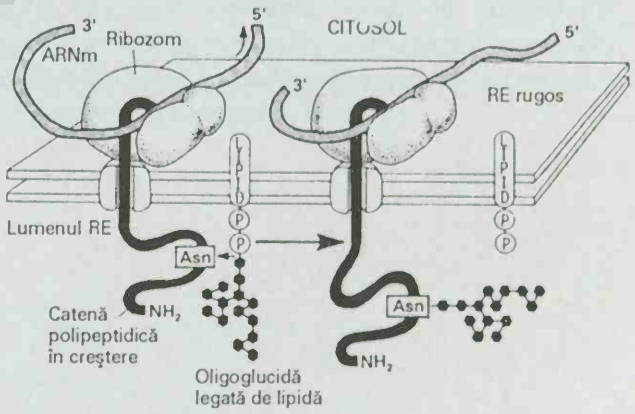


Fig. 14.34. Transferul oligoglucidei legată de lipid la restul de asparagină al proteinei.

UDP-galactoză + Glucoză $\xrightarrow{A+B}$ Lactoză + UDP

Proteina B interacționează cu proteina A, care este legată la membrana complexului Golgi, iar acest eveniment constituie inițierea lactației. Proteina B (α-lactalbumina) este excretată în lapte.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Biomembrane, receptori și transmiterea semnalelor

15

În acest capitol sunt descrise structura membranelor și rolul componentelor lor. Transferul de informație prin cascade de mesageri de la receptori, precum și transferul fizic al componentelor celulare sunt, de asemenea, discutate.

Membrana plasmatică este formată dintr-un strat dublu lipidic în care sunt împachetate proteine, inclusiv glicoproteine și glicolipide. Proteinele pot fi integrale – cu regiuni helicoidale ce traversează stratul lipidic - sau proteine periferice care sunt atașate mai slab, adesea prin grupări acil (acizi grași) sau prenil. Multe dintre proteine sunt receptori. Două grupuri importante de receptori îi includ pe cei care acționează prin intermediul proteinelor G și pe cei cu activitate tirozin-kinazică în domeniul citoplasmic.

Receptorii cuplați cu proteine G aparțin unei superfamilii având șapte domenii transmembranare. Receptorii cu activitate tirozin-kinazică sunt în principal implicați în controlul creșterii. Receptorii leagă liganzi și se reciclează printr-un sistem endozomal.

Transportul moleculelor mici prin membrana plasmatică e mediat prin proteine de transport și poate fi transport pasiv, facilitat sau activ. O familie diversă de molecule de adeziune mediază anumite tipuri de interacțiuni între celule de care sunt în contact.

În interiorul celulei, există un citoschelet format din microtubuli, microfilamente de actină și filamente intermediare. Transportul moleculelor și al organitelor celulare de-a lungul acestor filamente are loc printr-un proces similar cu mecanismul contracției musculare.

BCU IASI/UMF UNIVERSITY LIBRARY

PRINCIPII ALE STRUCTURII MEMBRANARE

ROLUL MEMBRANEI PLASMATICE

Membrana plasmatică formează o barieră între celulă şi mediul său extern, menţinând astfel interiorul celulei ca un sistem închis, ordonat. Această membrană este formată dintr-un strat dublu lipidic, a cărui structură este explicată detaliat mai jos, în care sunt împachetate proteine care acţionează ca receptori sau transportori. Aceste proteine permit celulei să se implice într-o interacţiune dinamică cu mediul înconjurător. Astfel, ea primeşte semnale de la hormoni şi factori de creştere. Anumiţi receptori leagă molecule de adeziune ce funcţionează ca agenţi de recunoaştere celulară şi permit celulei să reacţioneze/răspundă la contactul cu alte celule. Există comunicare între membrana plasmatică, care este „organul senzorial" al celulei, şi nucleu, care este centrul de control pentru multe activităţi celulare.

STRUCTURA STRATULUI DUBLU FOSFOLIPIDIC

În mod natural, fosfolipidele formează în soluţii structuri bistratificate, în contrast cu detergenţii şi acizii graşi care formează micelii. O parte a forţei necesare pentru formarea stratului dublu lipidic provine din faptul că, aşa cum se observă în figura 15.1, molecula fosfolipidică este formată dintr-un cap hidrofil şi o coadă hidrofobă. Astfel de molecule au tendinţa să formeze structuri în mediu apos, astfel încât grupările hidrofile să fie orientate spre mediul apos iar gruparea hidrofobă spre centrul structurii departe de moleculele de apă. O micelă de detergent are mai mult sau mai puţin o formă sferică, după cum se vede în fig. 15.2, dar cele două lanţuri laterale de acizi graşi ale unei fosfolipide sunt prea voluminoase pentru a se potrivi intr-o asemenea formaţie, astfel încât fosfolipidul adoptă structura bistratificată. Nu toate fosfolipidele au potenţial de formare a stratului dublu. Unele, precum fosfatidiletanolamina, având un grup hidrofil relativ mic, poate adopta o fază de tip hexagonal în membrană. După cum se vede în fig. 15.3, aceasta are forma unui miceliu inversat cu grupările hidrofile în centru. Fosfatidilcolina, pe de altă parte, stimulează formarea stratului dublu, singură sau în amestec cu alte fosfolipide, aşa cum se vede în fig. 15.4.

PROTEINE INTEGRALE

Proteinele membranare sunt de două tipuri: cele care au, pe lângă domeniile intracelulare şi extracelulare, domenii

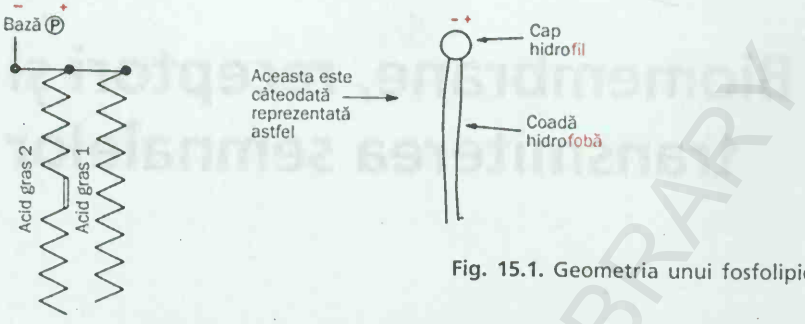


Fig. 15.1. Geometria unui fosfolipid.

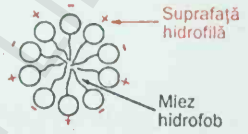


Fig. 15.2. Unele lipide şi majoritatea detergenţilor formează micelii sferice cu miez hidrofobic.

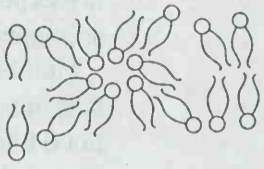


Fig. 15.3. Un miceliu inversat are miez hidrofilic.

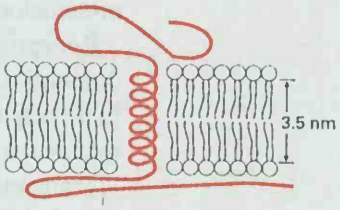


Fig. 15.4. Proteinele integrale traversează dublul strat lipidic şi au domenii citoplasmatice, transmembranare şi extracelulare.

hidrofobe care traversează stratul dublu lipidic o dată sau de mai multe ori, după cum e schiţat în fig. 15.4, şi proteine slab ataşate de membrană sau ataşate prin ancore lipidice. Proteinele care au domenii transmembranare sunt cunoscute ca proteine integrale sau intriseci, iar cele ataşate altfel sunt denumite proteine periferice. Domeniile hidrofobe transmembranare au o conformaţie helicoidală. Fiecare spiră a α-helixului necesită 0,541 nm, astfel încât lăţimea pasului hidrofob al stratului dublu de 3,5 nm permite 6-7 întoarceri. Exemple de proteine cu câteva domenii transmembranare şi cele ancorate in membrană prin alte mecanisme vor fi prezentate ulterior. Trebuie menţionat că pentru majoritatea proteinelor identificarea domeniilor transmembranare este bazată in prezent pe analiza secvenţei aminoacizilor; numai câteva zeci de structuri de proteine membranare au fost determinate până în prezent prin alte tehnici.

Secvenţa completă de aminoacizi este cunoscută pentru multe proteine integrale. Secvenţa uneia dintre acestea, glicoforina, este prezentată în fig. 15.5. Această proteină eritrocitară posedă glucide în domeniul său extracelular care au specificitate de grup sangvin. Resturile hidrofobe sunt prezentate în roşu şi se poate observa că domeniul transmembranar are multe astfel de resturi. Punctele de ataşare a resturilor glucidice sunt indicate prin pătrate, pentru lanţuri legate prin O („O-linked") şi hexagoane pentru lanţuri legate prin N („N-linked"). În acest caz, capătul N-terminal este extracelular, dar nu este cazul pentru toate proteinele integrale.

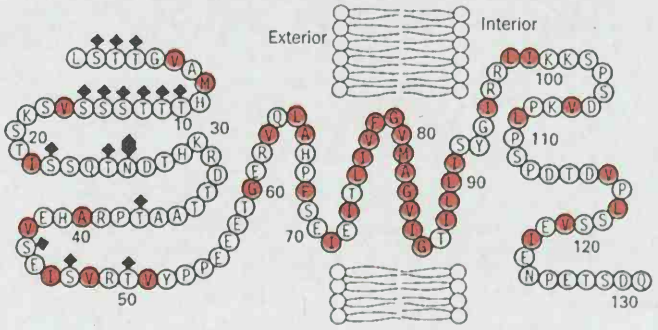


Fig. 15.5. Glicoforina are domenii structurale tipice pentru proteine transmembranare monohelicoidale („single –helix").

ANCORAREA PROTEINELOR PRIN LIPIDE

Multe proteine periferice (și în unele cazuri domenii de proteine integrale) sunt ancorate in membrana plasmatică prin legare la grupări acil sau izoprenil inserate in stratul dublu membranar, așa cum se prezintă în fig. 15.6. Legarea acizilor grași se poate face sub formă de esteri, tioesteri sau grupări N-acil. Grupările izoprenil sunt atașate de cisteină ca tioesteri. Descoperirea importanței grupărilor izoprenil a fost dedusă prin investigarea inhibiției creșterii celulare care rezultă din utilizarea inhibitorilor de HMG-CoA reductază. S-a găsit că inhibarea nu poate fi ușurată prin adăugare de colesterol și că izoprenilfarnesildifosfatul (vezi p. 155) și geranilgeranildifosfatul sunt esențiale pentru modificarea post-traducere a unor anumite proteine esențiale pentru creștere.

Geranilgeranil difosfatul este un izoprenoid cu 20 de atomi de carbon rezultat din farnesil difosfat (având 15 atomi de carbon), prin reacție cu izopentenil difosfat. S-a găsit anterior că un anumit număr de proteine se acilează prin acizi grași, cum sunt palmitatul și miristatul, în cursul procesării post-traducere. Fig. 15.6 arată un receptor cuplat cu o proteină G cu palmitoilat, printr-o legătură tioesterică la o cisteină conservată. Subunitatea α a proteinei G (vezi p. 189) are atașată o unitate miristat, printr-o legătură amidică la glicina N-terminală și subunitatea γ este arătată cu un grup geranilgeranil atașat la cisteina C-terminală cu gruparea carboxil metilată. În asemenea proteine, există o secvență de aminoacizi CAAX la capătul C-terminal care este implicat in această legare, grupul geranilgeranil fiind atașat de cisteină, iar AAX este eliminat prin metilarea cisteinei.

O altă metodă de atașare a lipidelor implică grupul glocozilfosfatidilinozitol. O astfel de structură este reprezentată în fig. 15.7. Proteina este atașată la gruparea gliconică și complexul este ancorat în membrană prin grupările acil ale fosfatidilinozitolului.

DINAMICA PROTEINELOR ÎN STRATUL DUBLU LIPIDIC

Așa cum este indicat în fig. 15.8 proteinele se pot mișca lateral în planul membranei și se pot roti în jurul unei axe verticale față de planul membranei. Totuși, proteinele nu se pot rostogoli prin planul membranei. Faptul că ele se pot mișca lateral este ilustrat foarte bine prin fenomenul de concentrare de tip pălărie („capping"). Acesta este numele dat efectului văzut când, de exemplu, un limfocit este stimulat de un mitogen marcat

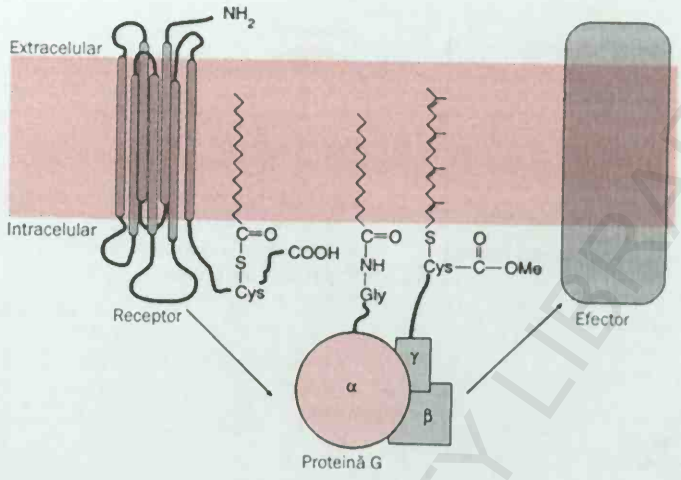


Fig. 15.6. Proteinele sau domeniile proteice pot fi atașate la membrane de către grupări acil sau prenil.

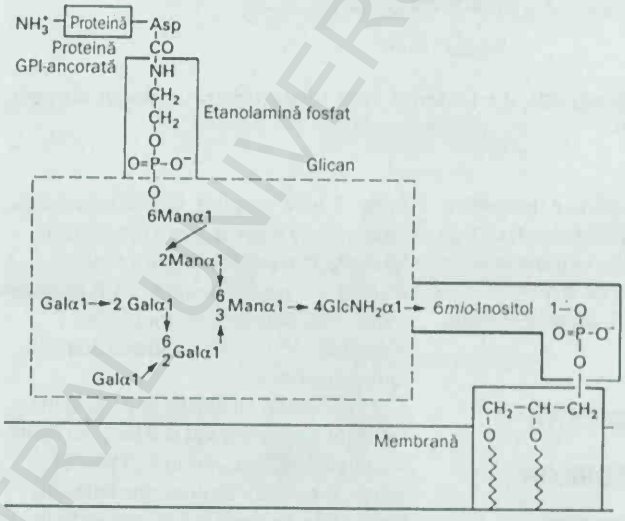


Fig. 15.7. Atașarea proteinelor la membrane prin ancore de tip glicozilfosfatidilinozitol.

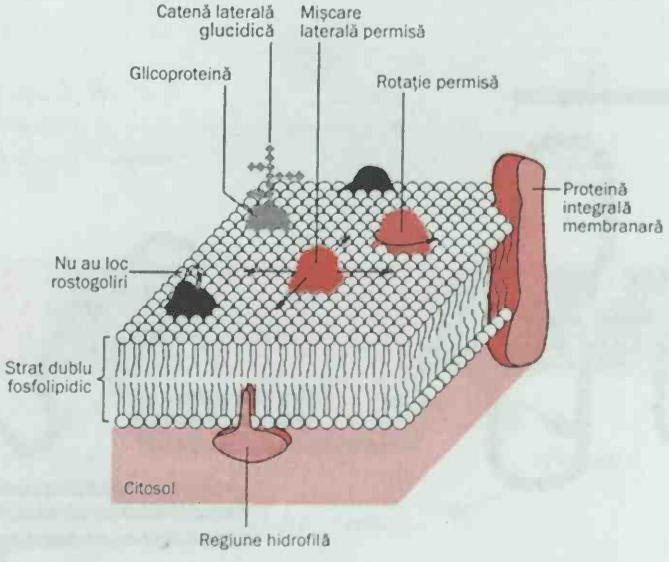


Fig. 15.8. Proteinele se pot roti și mișca lateral în membrană dar nu se pot rostogoli.

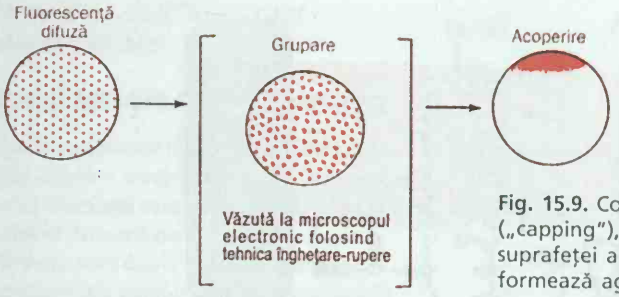


Fig. 15.9. Concentrare de tip pălărie („capping"), o caracteristică a suprafeței antigenelor care formează agregate.

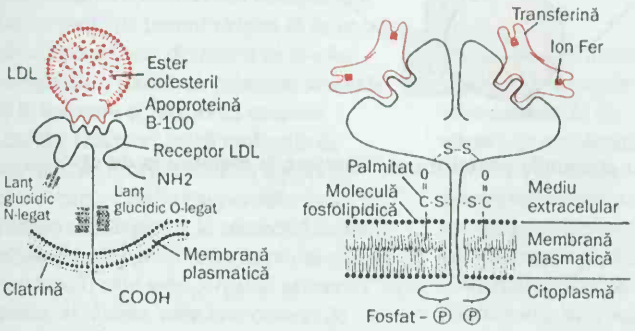


Fig. 15.10. Receptorii pentru LDL și transferină sunt formați dintr-un singur domeniu proteic transmembranar.

cu un fluorofom. Inițial, markerul fluorescent este distribuit pe toată suprafața celulei. După câteva minute, acesta începe să formeze o aglomerare („cluster") și după 30 minute formează o pălărie („cap"), așa cum se poate vedea în fig. 15.9.

RECEPTORI DE MEMBRANĂ

STRUCTURA RECEPTORILOR

Proteinele receptor din membrana plasmatică au un domeniu extracelular de care se poate lega un agonist sau un alt ligand care interacționează cu receptorul. În cazul unor receptori, funcția principală este aceea de internalizare a ligandului la interiorul celulei. Acesta este cazul receptorilor pentru apoproteina B și pentru transferină, ilustrat în figura 15.10. Receptorii de acest tip au adesea domenii intracelulare mici.

Alți receptori au funcția de a transmite semnalul spre interiorul celulei și au domenii intracelulare cu situsuri funcționale active, cum sunt receptorii care interacționează cu proteinele G (vezi mai jos) sau cei cu activitate protein-kinazică (vezi p. 192). Detaliile de structură ale receptorului β-adrenergic, care activează o proteină G, sunt arătate în figura 15.11. Acest receptor, asemenea multor receptori ce activează proteinele G, au 7 domenii transmembranare (7-TMD). Figura ilustrează multitudinea situsurilor pe proteină, care sunt necesare pentru o varietate de funcții. Asn-6 și 15 poartă glucide legate de azot („N-linked"). Situsurile Cys 106, 184, 190 și 191 sunt necesare pentru legarea liganzilor normali și exprimarea la suprafața celulară. Cum legarea ligandului este concepută să aibă loc în regiunea hidrofobă, aceste cisteine pot de fapt să stabilizeze conformația pliată corect. Asp-113 este conservat între toți receptorii 7-TMD care leagă amine biogene. Înlocuirea sa cu Asn determină o scădere puternică a potențialului agoniștilor în stimularea adenilat-ciclazei. Ser 204 și 207 sunt necesare pentru legarea normală și activarea agoniștilor catecolaminei. Un rest palmitoil este atașat la Cys-341 și penetrează stratul dublu, legând această parte a domeniului intracelular la suprafața intracelulară. Ser-260 și 346 sunt situsuri fosforilate de o protein-kinază AMPc dependentă (PKA).

RECEPTORUL INSULINIC

Receptorul insulinic a fost studiat destul de amănunțit. Este o proteină transmembranară mare, cu masa de aproximativ 350 kDa, compusă din două subunități α de 135-kDa și două subunități β de 95 kDa, legate prin punți disulfurice pentru a forma un β-α-α-β-heterotetramer, așa cum este arătat în figura 15.12. Ambele subunități sunt codificate de către o singură genă de aproximativ 150 de perechi de baze (kbp), cu 22 de exoni (bare gri în figura 15.12). separate prin 21 de introni. Traducerea ARNm determină formarea unui proreceptor care este glicozilat și formează legături disulfurice înainte de a se cliva pentru a

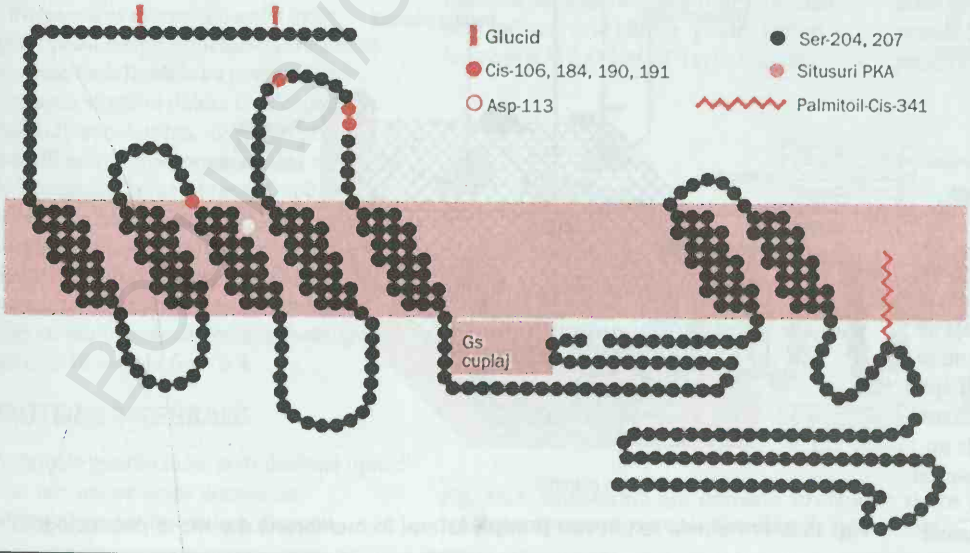


Fig. 15.11. Receptorul β-adrenergic este o proteină cu șapte domenii transmembranare.

forma receptorul matur (fig. 15.13). Acesta se inserează în membrana plasmatică printr-un domeniu transmembranar scurt prezent în fiecare din subunitățile β. Porțiunile citosolice ale subunităților β poartă domeniile protein-tirozin-kinazice. Asemenea altor receptori în activitate tirozin-kinazici (vezi p. 84), acestea pot fosforila tirozine în domeniul citosolic al receptorului - un proces cunoscut sub numele de autofosforilare. Acest proces este inițiat când receptorul este activat prin legarea insulinei. În plus, activitatea tirozinkinazică poate fosforila tirozine în proteine țintă. Receptorii mutanți care au subunități α defecte posedă activitate specifică tirozin-kinazică în absența insulinei, indicând că subunitatea α acționează ca o subunitate reglatoare, ce inactivează activitatea kinazică a subunității β; această inhibiție este eliminată prin legarea insulinei. Conform imaginii din partea stângă a figurii 15.12, un număr de mutații naturale au fost identificate la diabeticii având rezistență clinică față de insulină; acești pacienți au nevoie de doze de insulină de 10-1000 ori mai mari decât cele uzuale. În partea dreaptă a figurii, sunt indicate câteva situsuri în care prin mutageneza *in vitro* s-au putut identifica domenii funcționale arătate în partea extrem dreaptă.

Receptorul insulinei activat are un număr de proteine țintă, două dintre ele numite substraturi ale receptorilor insulinici IRS-1 și IRS-2. În figura 15.14 IRS-1 este fosforilat și influențează legarea și activarea altor proteine semnalizatoare, una dintre cele mai importante fiind fosfatidilinozitol (PI)-3'-kinaza. Aceasta duce la formarea inozitoltrifosfat (IP_3), care activează o cascadă protein-kinazică care fosforilează GLUT 4, stimulând legarea sa la membrana plasmatică musculară (p. 163) și fosfofructokinaza 2 (p. 165), care stimulează glicoliza.

ANALIZA PRIN CLONARE A RECEPTORULUI NICOTINIC PENTRU ACETILCOLINĂ

Receptorii pentru acetilcolină, un neuromediator, sunt clasificați în funcție de răspunsul lor la agoniștii nicotină și muscarină. Cele două tipuri de receptori sunt foarte diferite în structură, receptorii muscarinici fiind de tip 7 TMD, interacționând cu proteine G, în timp ce receptorii nicotinici au 4 domenii transmembranare și când sunt activați funcționează ca și canale ionice membranare.

Receptorul nicotinic pentru acetilcolină (AchR) are 5 subunități, două α și câte una β, γ și δ. Genele celor patru tipuri de subunități au fost clonate și produșii exprimați în oocite de *Xenopus* după injectarea ARNm

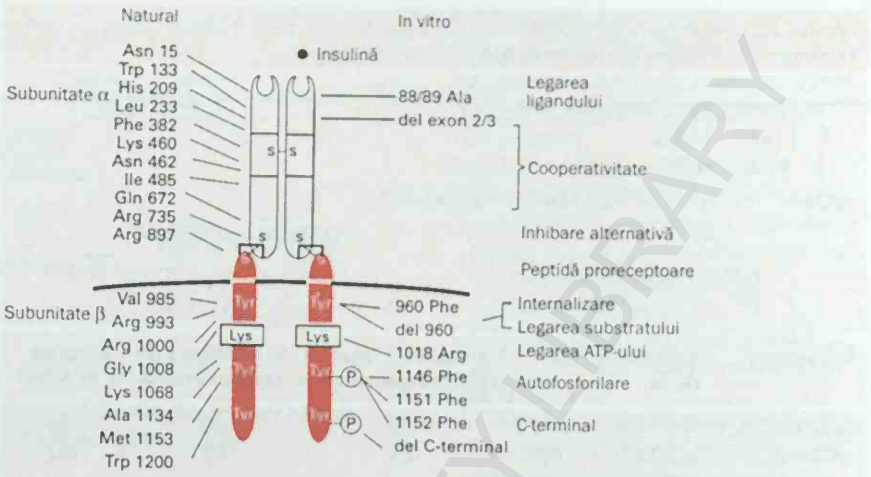


Fig. 15.12. Structura receptorului insulinic și funcția domeniilor sale.

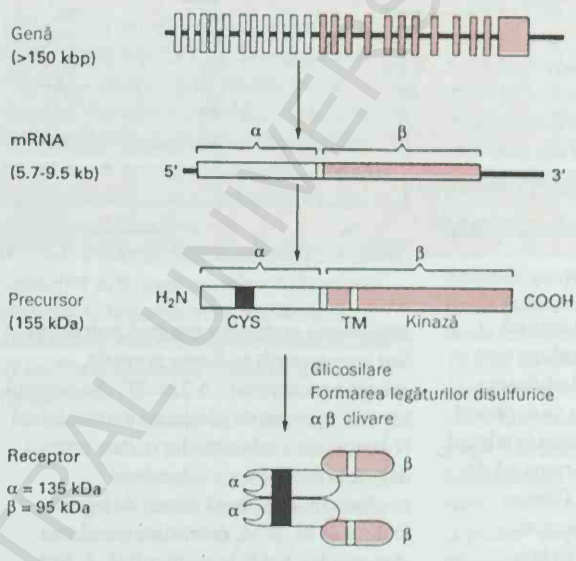


Fig. 15.13. ARNm specific receptorului insulinei determină sinteza unei polipeptide monocatenare care se scindează in lanțuri α- și β-.

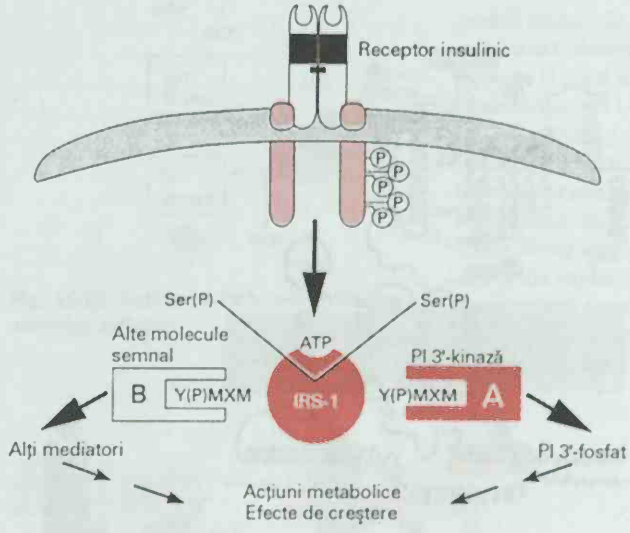
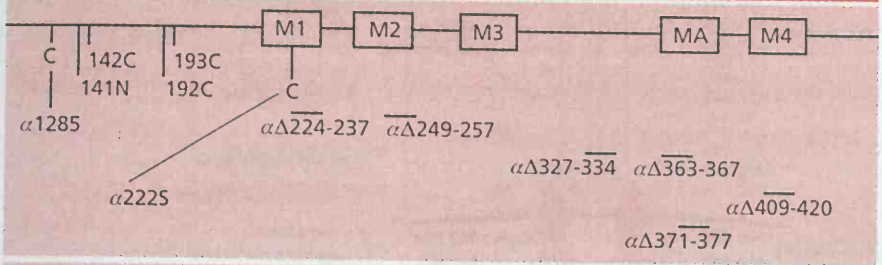


Fig. 15.14. Substraturile receptorului insulinei mediază acțiunea insulinei.

BUCHAREST CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 15.1. Mutageneza dirijată a genei receptorului pentru acetilcolină demonstrează rolul resturilor aminoacizilor individuali



Subunitate	Schimbare rest* de la	la	Activitate de legare a [125I] bungarotoxinei	% inhibare prin carbamilcolină	Răspuns la ACh (%)
Tipul sălbatic?			100	80	100
αΔ224-237	LFSFLTGL VFYLPT	PSS	0,5	NT	ND
αΔ249-257	VLLSLTV FL	SS	17	87	ND
αΔ327-334	STMKRASK	RAR	80	82	70
αΔ363-367	QTPLI	PSS	83	77	101
α128S	C	S	0,08	NT	ND
α222S	C	S	79	83	107
α141D	N	D	0,09	NT	ND
α142S	C	S	ND	NT	ND
α192S	C	S	39	27	ND
α193S	C	S	28	53	ND

Utilizând codarea aminoacizilor printr-o literă
ND - nedetectat
NT - netestat

transcris *in vitro*. S-a constatat apoi că oocitele posedă AchR funcțional, pe care în situații normale nu îl poartă. Modificarea genei pentru subunitatea α prin mutageneză dirijată rezultă în schimbări arătate în tabelul 15.1. Bungarotoxina este o neurotoxină de șarpe, *Bungarus multicinetus*. Este un antagonist puternic al AChR nicotinic, determinând paralizie; legarea sa este asemănătoare cu legarea acetilcolinei și este inhibată specific de către carbamilcolină. Capacitatea de legare a bungarotoxinei de majoritatea mutanților rezultați prin deleție a fost comparabilă cu forma normală, cu excepția mutantului αΔ 224-237. Segmentul M_1 este apropiat de porțiunea extracelulară N-terminală a subunităților α, deci această deleție poate induce o schimbare conformațională lângă situsul de legare. Deleții în M_1 și M_2 determină pierderea răspunsului AchR la acetilcolină. A fost investigată substituirea cisteinelor cu serine. Înlocuirea Cys-128 a anulat legarea și răspunsul AChR, în timp ce înlocuirea Cys-222 a avut efect nesemnificativ. Acest experiment, precum și altele, au facilitat analiza funcției receptorului ilustrată în figura 15.15, și experimentele ilustrează potențialul acestor tehnici în analiza funcției proteice.

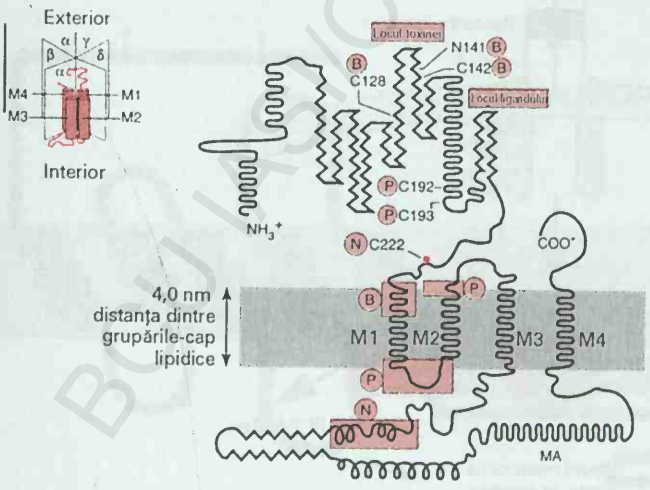


Fig. 15.15. Domeniile receptorului acetilcolinei. B = este afectată legarea acetilcolinei; P=este afectată tecerea sau permeația; N= fără efect.

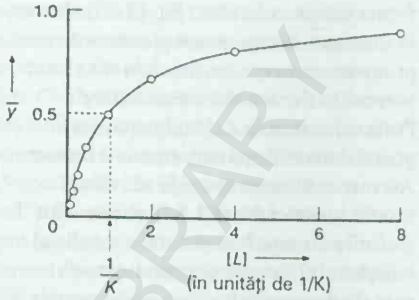


Fig. 15.16. Izoterma de adsorbție.

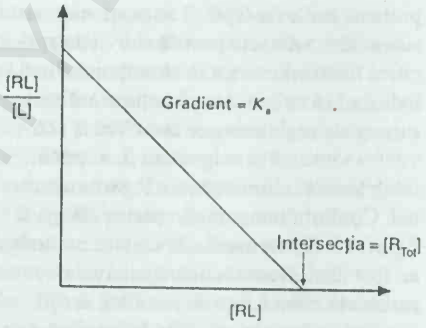


Fig. 15.17. Graficul Scatchard.

ANALIZA LEGĂRII DE RECEPTORI: REPREZENTARE SCATCHARD

O caracteristică a fenomenelor de legare a liganzilor este cinetica lor de saturare. Dacă în legarea unui ligand (L) de receptorul său (R), [L] reprezintă concentrația ligandului liber, iar [RL] concentrația ligandului legat, raportul între [RL] și alte forme (legate sau libere) ale receptorului, adică $[RL]/[R_{Tot}]$ este cunoscut sub numele de fracțiune de saturare și este dată de simbolul γ. O reprezentare a lui γ în funcție de [L] se numește izotermă de adsorbție conform figurii 15.16, în care K este constanta de asociere a complexului.

Valorile cel mai adesea deduse din datele de legare sunt constanta de disociere a complexului, K_a, și numărul total de molecule receptor $[R_{Tot}]$. Acestea se pot obține din reprezentarea [RL]/[L] în funcție de [RL] așa cum se poate vedea în figura 15.17. Aceasta este o reprezentare Scatchard și derivă din următoarea analiză. Constanta de asociere $K_a = [RL]/[L][R]$ unde [L] și [RL] au fost definite anterior și [R] este concentrația receptorului nelegat. Întrucât $[R] = [R_{Tot}] - [RL]$, rezultă $[RL]/([L][R_{Tot}] - [L][RL]) = Ka$

BUJ INSTITUTE OF MEDICINE UNIVERSITY LIBRARY

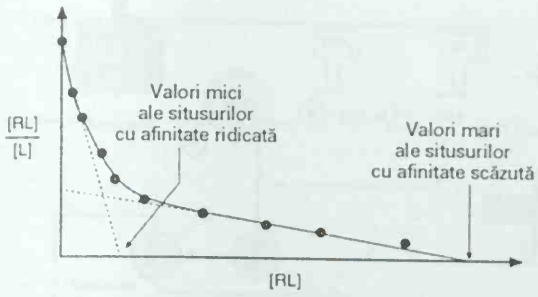


Fig. 15.18. Graficul neliniar Scatchard.

Prin rearanjarea relației rezultă [RL]/[L] = - Ka[RL] + Ka[R_{tot}], care este ecuația unei drepte cu panta negativă Ka și care intersectează abscisa [R_{tot}].

O reprezentare liniară Scarchard se obține numai dacă există o singură constantă de legare. Dacă sunt implicate situsuri cu diferite constante de legare, rezultă o curbă bifazică sau mai complexă.

O reprezentare de acest fel este arătată în figura 15.18, din care se poate extrage informația arătată în figură.

PROTEINE G

ACTIVAREA PROTEINELOR G

Mulți receptori activează adenilat-ciclaza, a cărei reacție este prezentată la pagina 85. Această activare depinde de cuplarea enzimei la receptor prin proteine G, numite astfel pentru că leagă nucleotide guanilice. Există două tipuri de proteine G: proteine heterotrimerice, având subunități α, β și γ, și proteine monomerice.

Activarea receptorilor ca rezultat al legării liganzilor activează adenilat-ciclaza prin proteine G heteromerice: următoarea descriere se referă la etapele mecanismului de activare, așa cum e prezentat în figura 15.19.

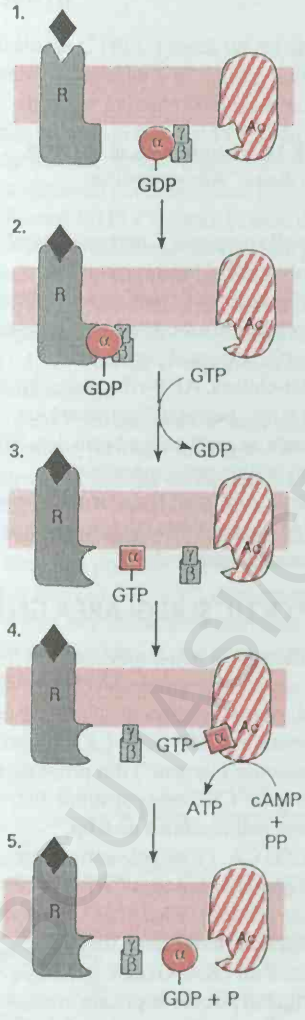


Fig. 15.19. Mecanismul de acțiune al proteinei G.

1. În stare neactivată, GDP se leagă de subunitatea α a proteinei G.
2. Ocuparea receptorului de către un ligand activator determină legarea proteinei G de receptor.
3. Acest tip de legătură determină schimbarea GDP cu GTP în subunitatea α și separarea complexului subunităților $\beta\gamma$ din complexul heterotrimeric, urmată de eliberarea subunității α cu conformație schimbată.
4. GTP-ul se leagă și activează adenilat ciclaza, care catalizează formarea AMP ciclic din ATP.
5. Subunitatea α are activitate GTP-azică și hidrolizează GTP la GDP și P. Aceasta determină disocierea subunității α din adenilat-ciclază, dezactivând-o și astfel complexul GDP-heterotrimer se reformează și este disponibil pentru un nou ciclu.

Activarea adenilat ciclazei prin subunitatea α rezultă în sinteza AMP ciclic și conduce la activarea PKA și a țintei din aval: serin-treonin (S/T) protein kinazele, așa cum se arată în figura 15.20.

SUPERFAMILIA PROTEINELOR G

Anumite proteine G heterotrimerice au un tip de subunitate α care inhibă mai degrabă decât activează, adenilat-ciclaza (figura 15.21). Subunitățile de inhibare α sunt denumite α_i în timp ce subunitățile stimulatoare sunt denumite α_s. Aceste subunități leagă complexele sale de receptori care funcționează prin inhibarea formării AMP ciclic. Proteinele G monomerice sunt „tipizate" după produsul de 21 kDa al oncogenei ras ($p21^{ras}$ - vezi mai jos).

Factorul de elongare bacteriană EF-Tu este o proteină G monomer. Structurile unor proteine din superfamilia G sunt schematizate în figura 15.22. Aceasta posedă situsuri de legare a două toxine care catalizează ribozilarea ADP a anumitor proteine G (vezi mai jos), CT indicând toxina holerei și IAP, proteina de activare a insulelor mici („Islets Activating Protein"). În această superfamilie, anumite regiuni înalt conservate de legare a GTP sunt recunoscute, așa cum se arată în figura 15.23. Multe date privind structura lor derivă din studiul cristalografic al $p21^{ras}$. Numerotarea resturilor specifice (cele subliniate) în comentariile următoare sunt legate de structura $p21^{ras}$. În G-1 motivul

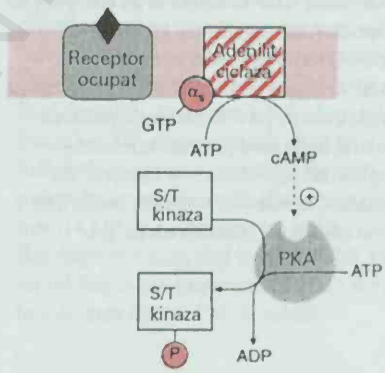


Fig. 15.20. Activarea PKA prin activitatea adenilat ciclazei.

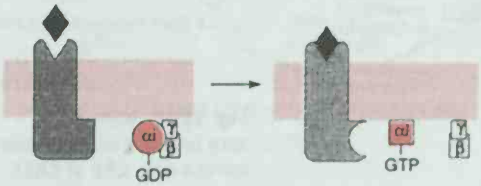


Fig. 15.21. Subunități α ale proteinei G inhibitoare.

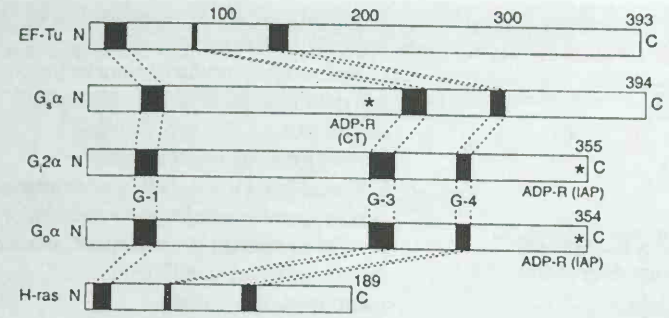


Fig. 15.22. Superfamilia proteinelor G.

	Resturi	G-1	Resturi	G-3	Resturi	G-4
EF-Tu	18-25	GHVDHGKT	80-84	DCPGH	135-138	NKCD
Gsα	47-54	GAGESGKS	223-227	DVGGQ	289-295	NKQD
Gi2α	40-47	GAGESGKS	201-205	DVGGQ	270-273	NKKD
Goα	40-47	GAGESGKS	201-205	DVGGQ	270-273	NKKD
Ha-ras	10-17	GAGGVGKS	57-61	DTAGQ	116-119	NKCD

Fig. 15.23. Omologii între proteinele G.

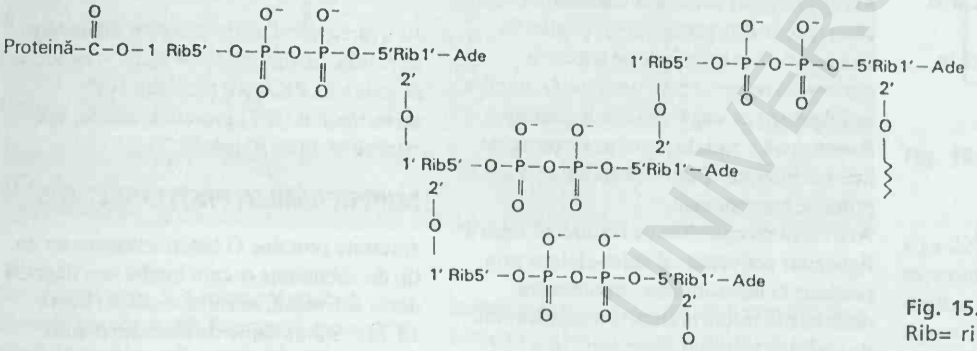


Fig. 15.24. Chimia ribozilării ADP. Rib= riboza; Ade=adenina.

secvenței de aminoacizi $GX_4GK(S/T)$ este implicat în legare prin grupări ε-amino ale Lys-10 la grupările fosfat α și β ale GTP sau GDP. Motivul DX_2G al regiunii G-3 leagă Mg^{2+} catalitic prin Asp-57, cu intervenția unei molecule de apă. În motivul caracteristic lui G-4, (N/T)(K/Q)XD, Asp-119 se leagă prin legături de hidrogen de heterociclul guanilic.

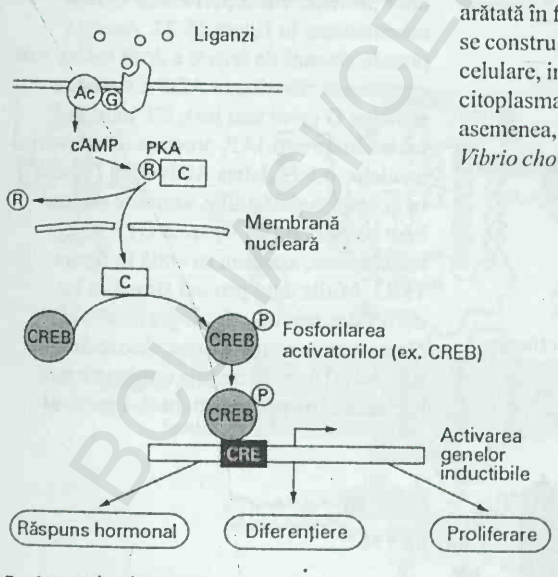
RIBOZILAREA ADP

Ribozilarea ADP se referă la un complex de molecule ADP legate prin grupările de riboză. O structură reprezentativă este arătată în figura 15.24. Un astfel de complex se construiește pe o varietate de proteine celulare, incluzând proteine nucleare și citoplasmatice. Acesta este implicat, de asemenea, în acțiunea toxinelor bacteriilor *Vibrio cholerae* („cholera toxin") și *Bordetella pertussis* („pertussis toxin"), agentul cauzal al tusei convulsive.

Toxina holerei determină ADP-ribozilarea α_s, împiedicând asocierea α_s cu subunitățile βγ și astfel activează permanent adenilat-ciclaza. ADP-ribozilarea lui α_i de către toxina „pertussis" activează, de asemenea, această enzimă prin dezactivarea acțiunii inhibitoare a subunității α_i. Grupările ADP sunt transferate la proteină din NAD^+ prin ADP-riboziltransferază, cu eliberarea nicotinamidei.

AMP CICLIC ȘI REGLAREA GENICĂ

Unul dintre cele mai importante efecte ale AMP ciclic este reprezentat prin exprimarea genică. Aceasta este mediată prin elementul de răspuns al AMP ciclic („CRE-cyclic A MP response element") din promotorul multor gene. CRE este constituit dintr-o secvență palindromică de 8 bp, TGACGTCA. Proteinele activatoare, cum este proteina de legare a CRE (CREB - CRE Binding protein) se leagă de CRE pentru a induce transcrierea, după fosforilarea catalizată de PKA. Genele induse de AMP ciclic includ pe cele implicate în acțiunea hormonilor, în diferențierea celulară și în proliferarea celulară. Sistemul este evidențiat în figura 15.25.



R = PKA subunitatea adaptoare
C = PKA subunitatea catalitică

Fig. 15.25. AMP ciclic este implicat în reglarea genică prin CRE și CREB.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

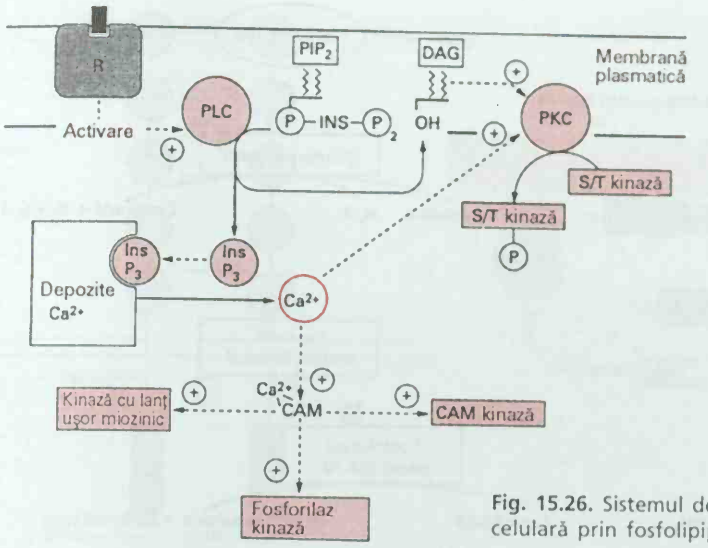


Fig. 15.26. Sistemul de semnalizare celulară prin fosfolipipaza C.

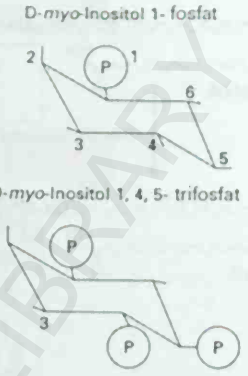


Fig. 15.27. Structura inozitolfosfaților.

SISTEME DE SEMNALIZARE CELULARĂ

FOSFOLIPAZA C ȘI INOZITOL FOSFAȚII

Fosfolipaza C (PLC) joacă un rol cheie în activarea sistemelor Ca^{2+}/calmodulină și PKC, descrise în capitolele anterioare. Diferiți membri ai familiei PLC hidrolizează diferiți fosfoinozitoli la diacilglicerol și grupul terminal corespunzător. Izoforma γ a fosfolipazei C (PLC-γ) este în mod deosebit importantă în medierea semnalizării prin factorul de creștere. Descoperirea importanței reacției de hidroliză a PIP_2 la diacilglicerol și inozitol 1,4,5-trifosfat (Ins[1,4,5]P_3) a avut o importanță capitală în acest domeniu.

Ins (1,4,5) P_3 eliberează Ca^{2+} din rezervele intracelulare, probabil localizate, în principal, în reticulul endoplasmatic. În continuare, Ca^{2+} și diacilglicerolul, acționând împreună, activează PKC care, la rândul său, activează ținta sa din aval, protein-kinazele S/T. Ca^{2+}, de asemenea, prin legare de calmodulină activează la rândul său alte kinaze, așa cum se poate vedea în figura 15.26.

METABOLISMUL INOZITOLFOSFAȚILOR

Structurile D-mio-inozitol 1-fosfatului și D-mio-inozitol 1,4,5-trifosfatului sunt arătate în figura 15.27. În inozitolfosfolipide, gruparea fosfat din C-1 este esterificată cu o grupare diacilglicerol. Un număr considerabil de mare de inozitolfosfați pot fi formați din $InsP_3$. Produșii se recirculează la inozitol care apoi participă la resinteza $PtdInsP_2$. Câteva dintre cele mai importante reacții sunt prezentate în figura 15.28. După hidroliză $PtdInsP_2$ la $InsP_3$ și diacilglicerol (DAG), DAG este fosforilat de o kinază la fosfatidat (PtdOH), care apoi reacționează cu CTP rezultând CMP-PtdOH (prescurtare alternativă a CDP-DAG). Fosfataze cu grade diferite de specificitate convertesc $InsP_3$ la inozitol (Ins) care apoi poate reacționa cu CMP-PtdOH pentru a forma PtdIns și alți fosfoinozitoli. $InsP_3$ poate fi fosforilat la Ins(1,3,4,5)P_4 care urmează alte căi metabolice, așa cum se arată în figură. La puțini din acești inozitolfosfați, cu excepția Ins(1,4,5)P_3 li s-a atribuit un rol în fiziologia celulară, deși Ins(1,3,4,5)P_4 joacă un rol important împreună cu Ins(1,4,5)P_3 în activarea intrării Ca^{2+} în celulă.

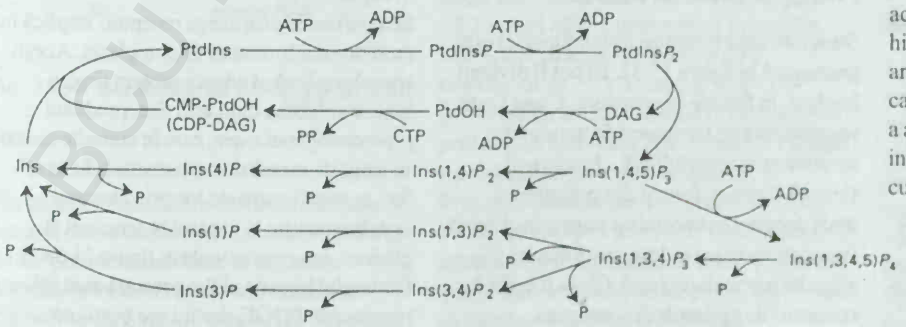


Fig. 15.28. Metabolismul inozitolfosfaților și a fosfoinozitolilor.

FOSFOINOZITOL 3'-KINAZA

Alți fosfoinozitoli rezultă prin fosforilare la poziția 3' catalizată de către kinaze. În una din cele mai importante dintre aceste reacții se formează PtdIns(1,3,4,5)P_4 din PtdIns(1,4,5)P_3, prin cataliza fosfoinozitol (PI) 3'-kinazei. Fosfoinozitolii cu grupare fosfat în poziția 3' sunt implicați în semnalizarea celulară, dar aparent fără a fi hidrolizați de fosfolipaza C. Ei par să activeze anumite protein kinaze și formează o nouă clasă importantă de molecule semnalizatoare.

SFINGOLIPIDE ÎN SEMNALIZARE

În plus față de cele descrise mai sus, alte lipide pot acționa ca molecule semnalizatoare; acestea includ sfingolipidele și prostaglandinele descrise anterior. Cea mai importantă moleculă semnalizatoare derivată din sfingolipide este ceramida. Aceasta rezultă din sfingomielină, ca rezultat al activării sfingomielinazei (figura 15.29). Este implicată în activarea anumitor receptori de suprafață celulară, incluzând receptorul factorului de necroză tumorală (TNF), receptorul interleukinei 1 și receptorul factorului de creștere neurală. Enzimele activate de către ceramidă includ o protein kinază și o protein fosfatază. În cazul receptorului TNF, așa cum este ilustrat în figura 15.30, protein kinazele sunt țința majoră și acestea includ cascada proteinkinazică, inclusiv kinazele ce activează fosfolipaza A_2 citosolică. Aceasta hidrolizează fosfolipidele ce conțin acid arahidonic, eliberând acidul arahidonic, care servește la sinteza prostaglandinelor și a altor produși ce sunt implicați în reacția inflamatoare. Sfingozina este, de asemenea, cunoscută ca moleculă semnalizatoare.

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

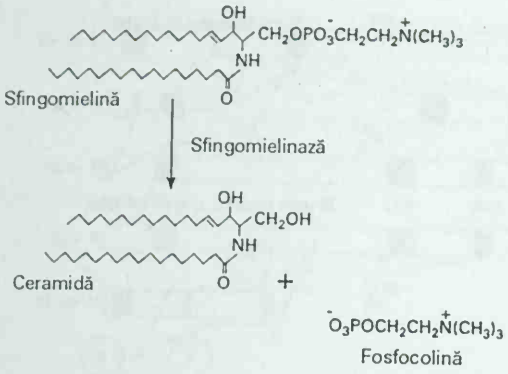


Fig. 15.29. Acțiunea sfingomielinazei.

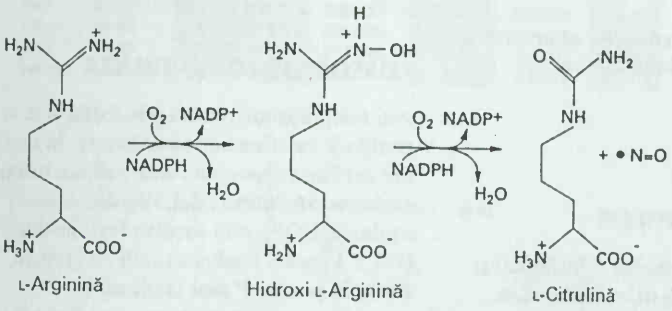


Fig. 15.31. Biosinteza oxidului de azot din arginină.

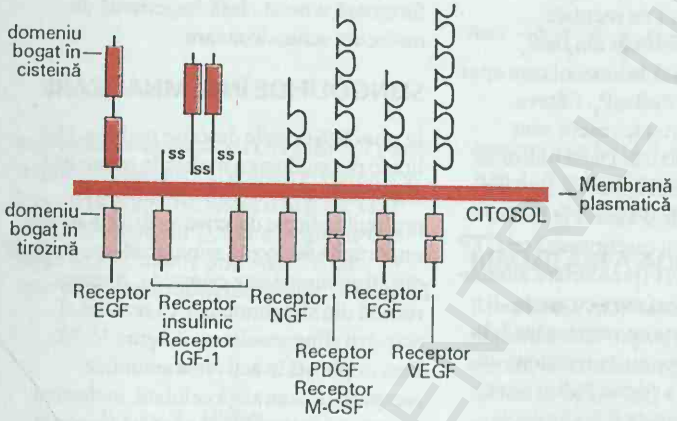


Fig. 15.32. Clasele de receptori protein tirozin kinazici.

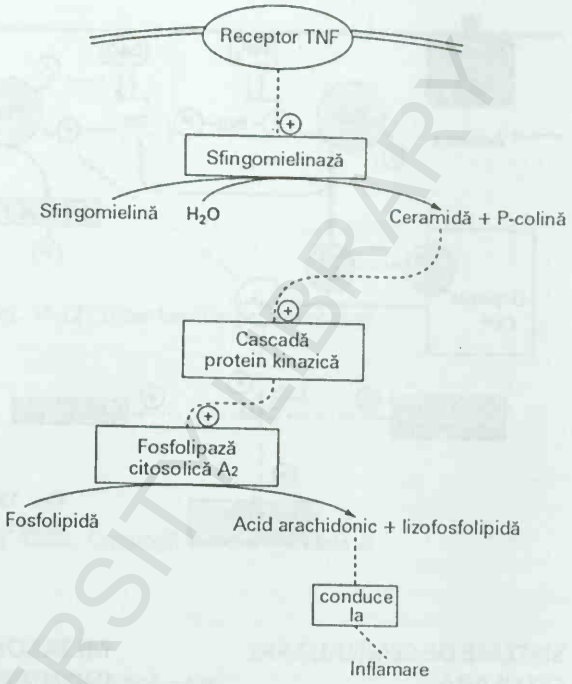


Fig. 15.30. Sfingolipidele sunt implicate în semnalizarea celulară.

OXIDUL DE AZOT ÎN SEMNALIZAREA CELULARĂ

Oxidul de azot (NO), asemenea prostaglandinelor, este o moleculă semnalizatoare intercelulară, spre deosebire de moleculele intracelulare discutate anterior. Este un important reglator cardiovascular, crescând presiunea sangvină. Este produs de neuroni și macrofage, în ultimul caz ca armă contra agenților patogeni. Deși are număr impar de electroni și este radical liber, este relativ stabil din punct de vedere chimic, dar reacționează rapid cu specii având electroni impari, cum este oxigenul molecular, anionul superoxid și metalele (vezi p. 131). Ia naștere din arginină, pe calea ilustrată în figura 15.31.

PROTEIN TIROZIN KINAZE

Structura unor receptori tirozinkinazici este prezentată în figura 15.32. Ei pot fi divizați în clase, în funcție de structură. Clasa I este reprezentată de receptorul factorului de creștere epidermică (EGF - Epidermal Growth Factor), format din proteine cu două domenii extracelulare bogate în cisteină (marcate cu roșu) și domeniu kinazic singular intracelular (roz). Clasa II include receptori de tip insulinic - structuri heterotetramerice $\alpha_2\beta_2$ legate prin punți disulfurice. Aceștia au, de asemenea, domenii repetitive bogate în cisteină (marcate roșu) și domenii intracelulare kinazice (roz). Receptorii din clasa III sunt caracterizați prin cinci (5) domenii extracelulare de tip imunoglobulinic („bucle albe") cu domeniu kinazic (roz) având o inserție ne-kinazică. Clasa IV este similară clasei III dar numai cu 3 domenii de tip imunoglobulinic (vezi și figura 5.19). Domeniul kinazic poate nu numai să fosforileze alte proteine, dar se poate autofosforila, de multe ori la situsuri diferite, fiecare situs având o funcție specifică în legarea și activarea diferitelor molecule semnal din aval. Figura 15.33 ilustrează acest fapt pentru factorul de creștere derivat din plăcuțe sanguine (PDGF - Platelet Derived Growth Factor). Aceste proteine sunt parte a sistemului de semnalizare care este activat de PDGF. Câteva dintre acestea au fost descrise. Grb2 și Shc sunt molecule cunoscute ca adaptori ce leagă alți membri ai sistemului de semnalizare și sunt discutate în capitolul 16.

Semnalizarea prin acești receptori implică în mod normal formarea de complecși. Acești complecși includ adesea protein tirozin kinaze solubile, cum ar fi Src, produsul protooncogenei *c-src*, care în anumite cazuri se leagă de membrana plasmatică. În cazul Src, această legare are loc prin atașarea restului miristat la capătul N-terminal al glicinei, așa cum se vede în figura 15.34. Domeniul kinazic al Src prezintă analogie cu receptorul PDGF, dar nu are porțiune

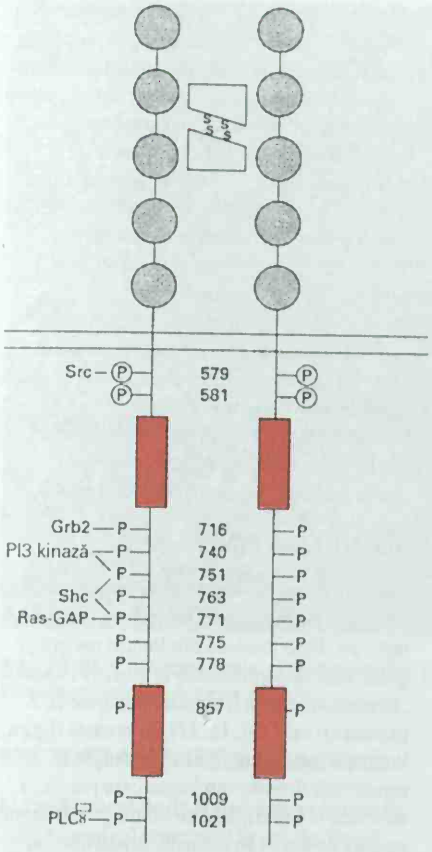


Fig. 15.33. Structura domeniilor receptorului PDGF și a situsurilor sale de fosforilare.

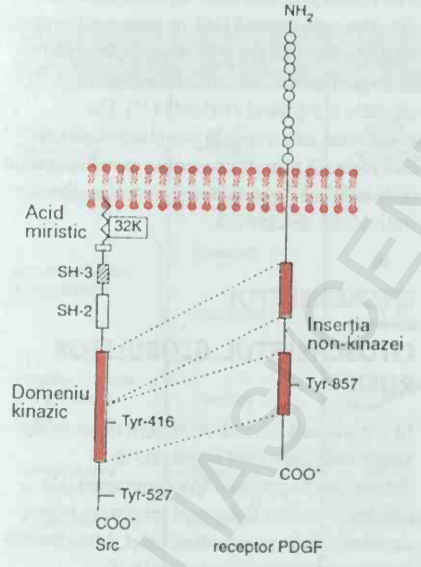


Fig. 15.34. Domeniile de omologie Src (SH).

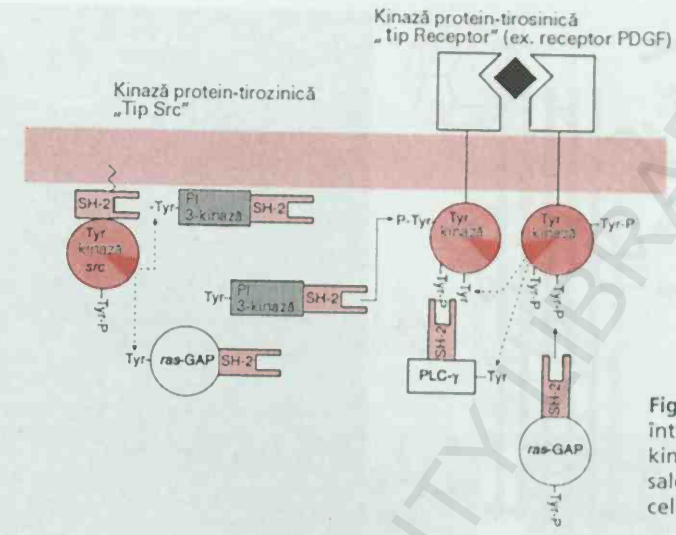


Fig. 15.35. Interacțiuni între receptorul tirozin kinazic și substraturile sale în stimularea celulară.

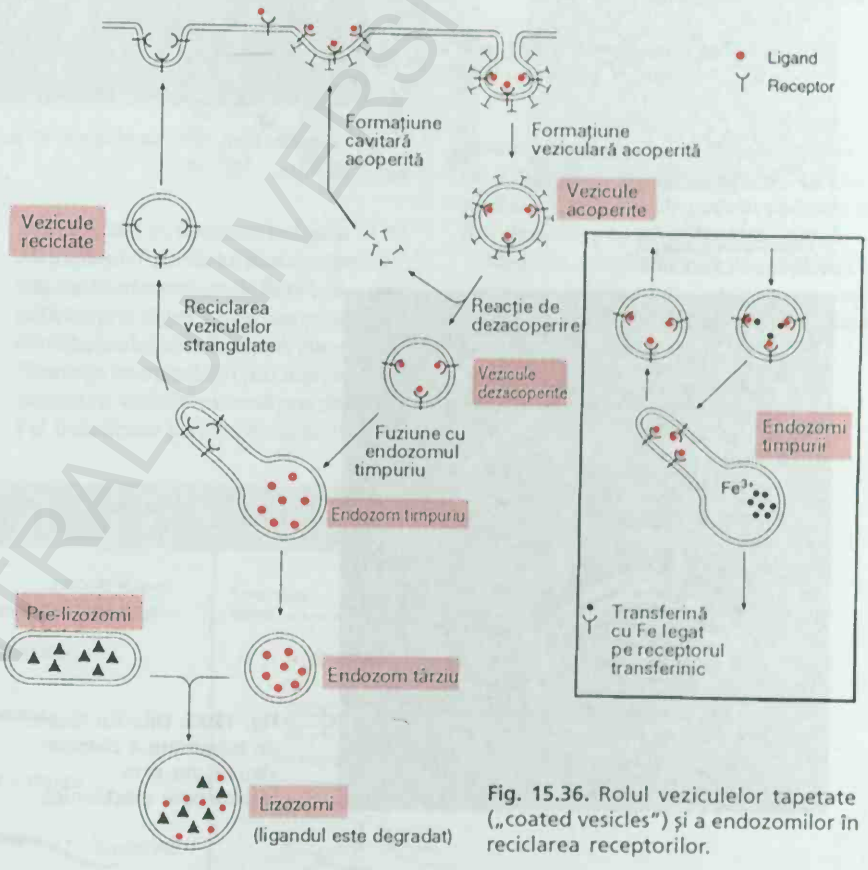


Fig. 15.36. Rolul veziculelor tapetate („coated vesicles") și a endozomilor în reciclarea receptorilor.

(inserție) ne-kinazică în domeniul kinazic. Src are, de asemenea, două domenii găsite în multe proteine implicate în legarea complecșilor de activare. Acestea sunt cunoscute ca domenii omoloage Src (SH), pentru că au fost găsite întâi în Src. SH-2 leagă specific tirozine fosforilate. Figura 15.35 arată câteva interacțiuni tipice. Src este arătat ca agent de fosforilare a tirozinelor în PI-3' kinază și Ras-GAP (proteina de activare a RasGTPazei), o proteină ce activează activitatea GTP-azică a produsului protooncogenei *ras*. Proteinele fosforilate sunt legate la tirozin fosfați în receptorul PDGF. Fosfolipaza C specifică fosfoinozitolului (PLC-γ, una din izoformele enzimei) se leagă, de asemenea, ca parte a complexului receptor.

TRAFICUL DE RECEPTORI

SISTEMUL ENDOZOMAL

Liganzii legați de receptorii de suprafață sunt internalizați printr-un sistem de vezicule, așa cum este descris pentru receptorul LDL (vezi p.155). Receptorii se „concentrează" în zone membranare cunoscute ca invaginări tapetate. Aceste zone membranare sunt tapetate la interior de către o proteină numită clatrină. La legarea ligandului, membrana se invaginează și formează o veziculă tapetată („coated

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

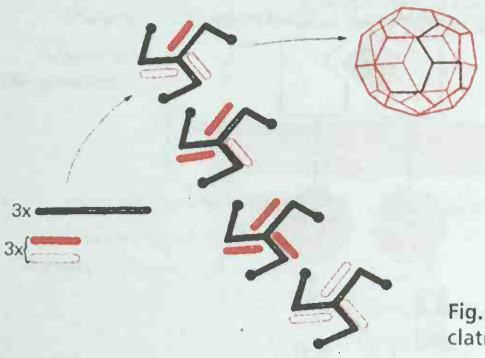
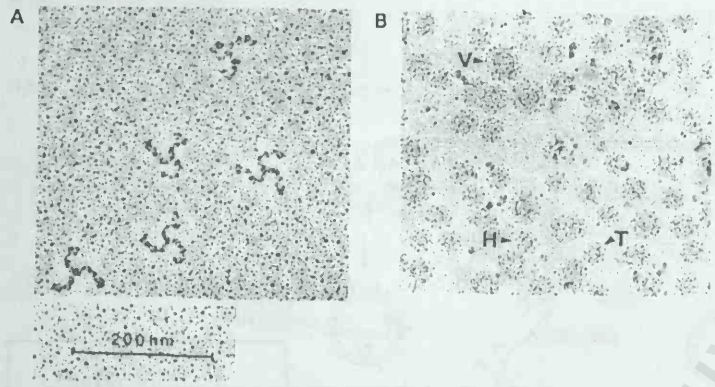


Fig. 15.37. Structuri „triskelion" ale clatrinei de tip „minge de tenis".



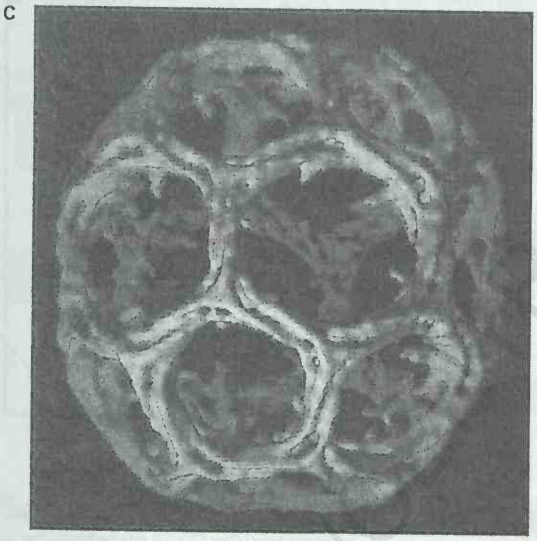
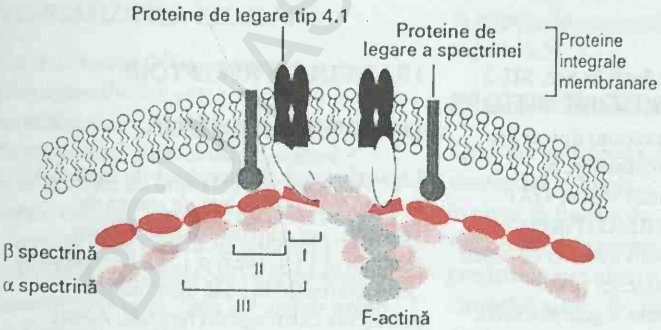


Fig. 15.38. Diferite nivele de asamblare a clatrinei vizualizate prin microscopie electronică.



Situsuri spectrinice pentru:
I: F-actină şi legare proteină 4.1
II: Legare proteine integral membranare
III: Legături înlănţuite

Fig. 15.39. Componentele citoscheletului globulelor roşii.

vesicle") (figura 15.36). Veziculele pierd apoi clatrina şi intră în sistemul endozomal primar. Acesta pare să fie alcătuit dintr-un sistem de vezicule preexistente sau tubuli cu care veziculele netapetate fuzionează. Endozomul primar are capacitatea de a induce disocierea ligandului de receptor şi apoi se divizează într-o veziculă care se reciclează în membrana plasmatică împreună cu receptorul şi o veziculă, cunoscută ca endozom matur (late) care fuzionează cu un lizozom, determinând procesarea ligandului. Există variante ale acestei scheme de acţiune. De exemplu, în cazul receptorului transferinei (vezi inserţia), transferina şi receptorul său se reciclează ambii înapoi în membrana plasmatică, numai fierul fiind disociat.

ROLUL CLATRINEI

Clatrina este o moleculă ce controlează formarea de invaginări tapetate şi vezicule tapetate. Este formată din lanţuri uşoare şi grele, care se asamblează în structuri numite „triskelion" (de la trischelet, imagine cu 3 picioare) (vezi fig. 15.37). În această figură, lanţurile uşoare marcate cu roşu şi roz reprezintă diferite izoforme care par să se asocieze la întâmplare cu lanţul greu (marcat negru). *In vitro*, structurile „triskelion" se pot asocia reversibil în structuri de tip nacelă, reprezentate tridimensional în figura 15.37. Figura 15.38 prezintă o imagine electronmicroscopică a unui triskelion individual (A), vezicule tapetate necolorate din placenta umană (B), în care pot fi văzuţi cilindrii hexagonali (H), structuri numite „minge de tenis" (T) şi formaţiuni mari tapetate conţinând vezicule (V). De asemenea, este vizibilă structura clatrinei determinată prin microscopie crioelectronică (C), arătând împachetarea triskelionilor individuali de clatrină.

CITOSCHELETUL

CITOSCHELETUL GLOBULELOR ROŞII

În citoplasmă, există un sistem de proteine structurale care sunt implicate în determinarea proprietăţilor mecanice ale celulei. Acestea formează un sistem intern de fibre cunoscut ca citoschelet. În globulele roşii componentele principale ale citoscheletului sunt spectrina şi actina. Cum se arată în figura 15.39, lanţurile α şi β ale spectrinei interacţionează prin intermediul oligomerilor de actină şi tropomiozină cu ankirină, legând spectrina de membrana eritrocitului. Banda proteică 4.1 numită astfel datorită poziţiei sale în electroforegramele proteinelor din eritrocite, poate să fie, de asemenea, implicată în legarea de membrana plasmatică.

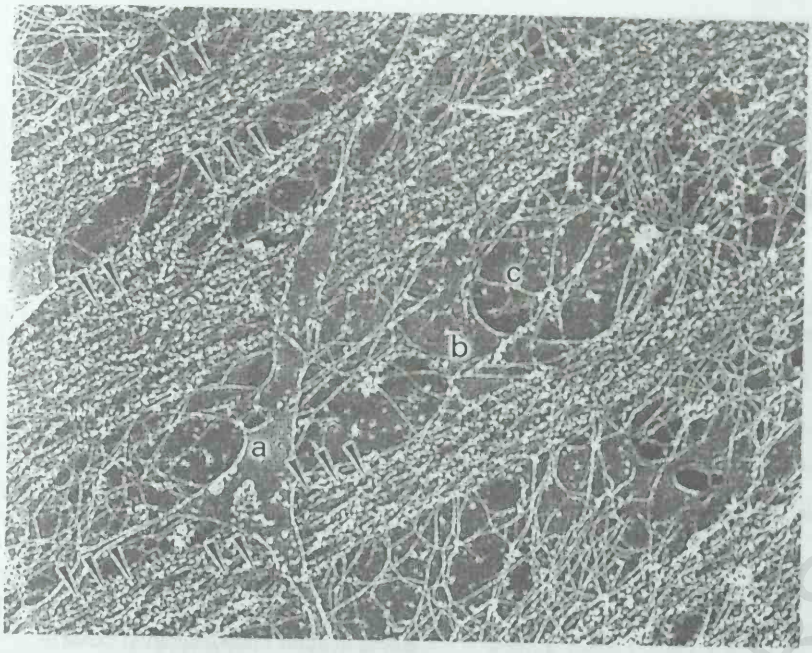


Fig. 15.40. Componentele citoscheletului pot fi vizualizate prin microscopie crioelectronică („freeze-etch").

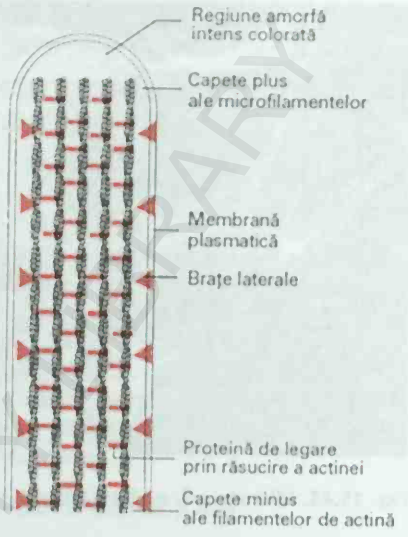


Fig. 15.41. Aranjarea filamentelor de actină într-un microvil.

MICROFILAMENTELE DE ACTINĂ

Microfilamentele de actină sunt polimeri de actină ce au rol structural în celulă. După eliminarea altor proteine, filamentele de actină pot fi vizualizate prin tehnica microscopică deja cunoscută de tip „freeze-etch" așa cum se arată în imaginea reprezentând un fibroblast în figura 15.40. Majoritatea filamentelor sunt agregate în mănunchiuri compacte de fibre tensionate, indicate prin săgeți. O altă componentă a citoscheletului, cunoscută sub numele de filamente intermediare (vezi mai jos) este de asemenea, vizibilă (indicată prin steluță). Pot fi observate porțiuni de membrană plasmatică așezate deasupra, indicate prin (a) și dedesubtul citoscheletului (b). La poziția (c), toate membranele de dedesubt au fost eliminate prin tratament cu detergent.

Modul în care filamentele de actină sunt organizate într-un microvil este reprezentat în schema din figura 15.41. Filamentele sunt aranjate în mănunchiuri, unite prin alte proteine structurale. Cele 2 capete ale filamentelor au polaritate și sunt denumite capete plus și minus.

Funcțiile proteinelor	Exemple de proteine	Forme, mărimi și mase moleculare comparative	Schema interacțiunii cu acțiunea
Formarea filamentelor	Actină	50nm 370 × 43 kDa/μm	Terminație minus, Terminație plus, Adiția subunității favorite
Întărirea filamentelor	Trompomiozină	2 x 35 kDa	
Înmănunchierea filamentelor	Fimbrină	68 kDa	10 nm
	α-Actinină	2 × 100 kDa	40 nm
Legarea în cruce a filamentelor în gel	Filamină	2 x 270 kDa	
Fragmentarea filamentelor	Gelsolină	90 kDa	Ca^{2+}
Alunecarea filamentelor	Miozină	2 x 260 kDa	ATP
Mișcarea veziculelor pe filamente	Minimiozină	150 kDa	ATP
Completarea terminațiilor „plus" și atașarea lor la membrana plasmatică	(necunoscut)	?	
Atașarea situsurilor filamentelor la membrana plasmatică	Spectrină	α β 2 × 265 kDa plus 2 × 260 kDa β α	
Sechestrarea monomerilor de actină	Profilină	150 kDa	

Fig. 15.42. Formele și mărimile unor proteine din citoschelet.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

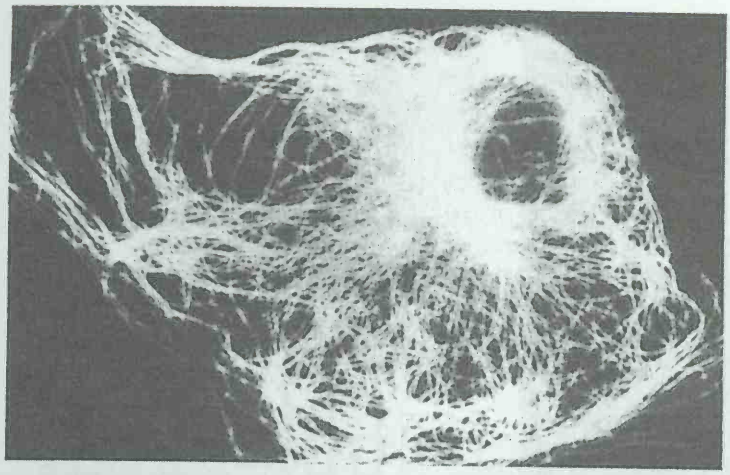


Fig. 15.43. Microtubuli evidențiatî prin microscopie de imunofluorescență.

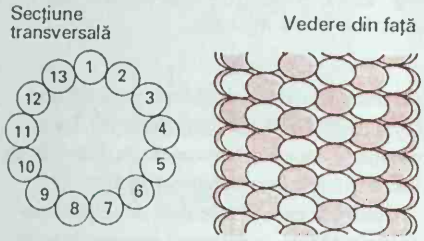


Fig. 15.44. Microtubulii sunt polimeri ai tubulinei.

S-a constatat că un număr în creștere de proteine este asociat cu sistemul de filamente de actină. Unele dintre acestea sunt înregistrate în figura 15.42: se indică mărimea și forma diferitelor molecule precum și modul în care acționează pentru diferite funcții.

MICROTUBULI

Citoplasma este străbătută și de o rețea de microtubuli (vezi capitolul 1). Aceștia sunt formați din tubulină și dacă un anticorp fluorescent anti-tubulină este utilizat pentru colorarea celulei, această rețea poate fi vizualizată, după cum se vede în figura 15.43. Microtubulii tind să radieze dinspre nucleu, în jurul căruia se observă cea mai intensă colorare.

Tubulina este formată din heterodimeri de subunități α și β, care formează polimeri cilindrici, după cum se vede în figura 15.44 (α tubulin în roz și β-tubulin în alb). Polimerizarea tubulinei poate fi realizată *in vitro*. Aceasta necesită prezența GTP care se leagă de subunități ce au activitate GTP-azică. Pe măsură ce filamentul de tubulină crește, el conține subunități cu GDP legat și un capăt de creștere a subunității cu GTP legat. Prezența GTP stabilizează polimerul și activitatea GTP-azică poate regla viteza creșterii.

Microtubulii joacă un rol major în diviziunea celulară. Printre alte funcții, ei formează fibrele fusului de diviziune care separă cromozomii în faza M a diviziunii celulare.

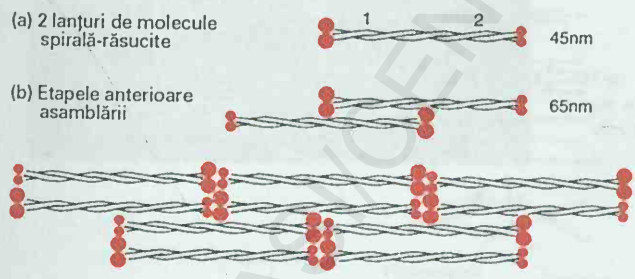


Fig. 15.45. Filamentele intermediare sunt polimeri ai keratinelor și a proteinelor similare.

FILAMENTE INTERMEDIARE

O altă componentă a citoscheletului constă din structurile cunoscute sub numele de filamente intermediare. Acestea sunt formate prin polimerizarea proteinelor, cum ar fi de tip keratinele. Keratina poate fi de diferite tipuri. Kelatinele dure formează structuri cum ar fi unghii, copite și pene. Altele, cunoscute sub numele de citokeratine se găsesc în multe tipuri celulare și există în diferite izoforme. Figura 15.45 arată stadii ale polimerizării acestor keratine în filamente.

Primul stadiu este formarea unui heterodimer între două izoforme (indicate cu 1 și 2); acești heterodimeri polimerizează apoi în structuri mai extinse. Alte tipuri de proteine formează de asemenea structuri de tip filament intermediar. În nucleu, laminele A, B și C sunt proteine de tip filamente intermediare ce formează lamina nucleară și sunt importante pentru menținerea membranei nucleare (vezi p. 3).

TRANSPORTUL PRIN MEMBRANĂ

DIFUZIE FACILITATĂ ȘI TRANSPORT ACTIV

Una din funcțiile membranei plasmatice și a altor membrane celulare este controlultrecerii unor molecule mici care trebuie preluate sau care sunt eliminate din celulă sau dintr-un compartiment celular. Un tip de transport este difuzia facilitată (vezi figura 15.46). Aceasta este independentă energetic și poate funcționa în sensul descreșterii gradientului de concentrație (figura 15.46). Un alt tip de transport, cunoscut ca transport activ (figura 15.46) trebuie realizat acționat adesea prin includerea unei reacții de hidroliză a ATP la ADP și Pa. Acest transport are loc împotriva gradientului de concentrație.

O caracteristică a sistemelor de transport, inclusiv a difuziei facilitate, este cinetica de saturare, așa cum este arătat în figura 15.47. Aceasta indică existența unui situs de transport care poate fi ocupat numai de un număr limitat de molecule. Poate avea loc inhibiția și valoarea K_m poate fi calculată

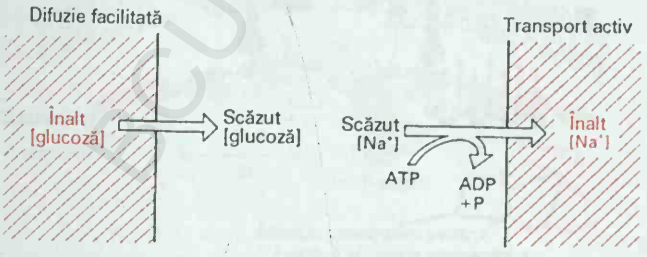


Fig. 15.46. Difuziunea facilitată este dependentă de concentrație iar transportul activ este dependent de energie.

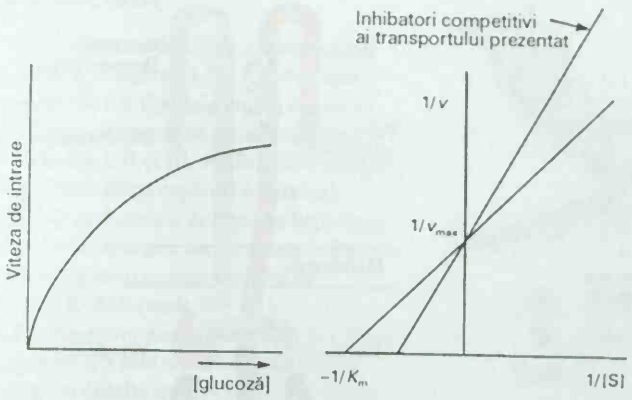


Fig. 15.47. Cineticile de transport sunt similare cu cinetica enzimatică.

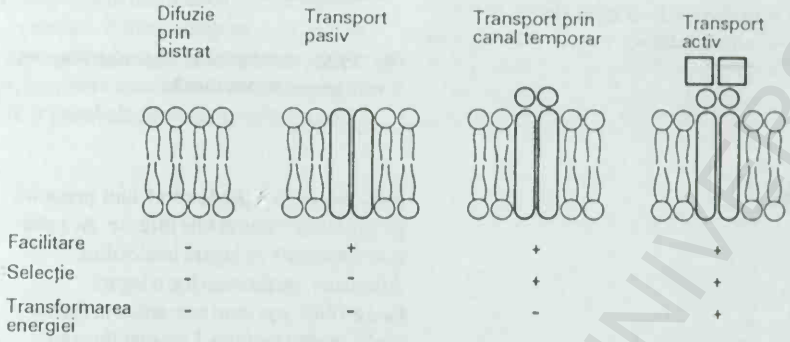


Fig. 15.48. Transportorii formează un canal transmembranar și unii au porți și/sau domenii donoare energie.

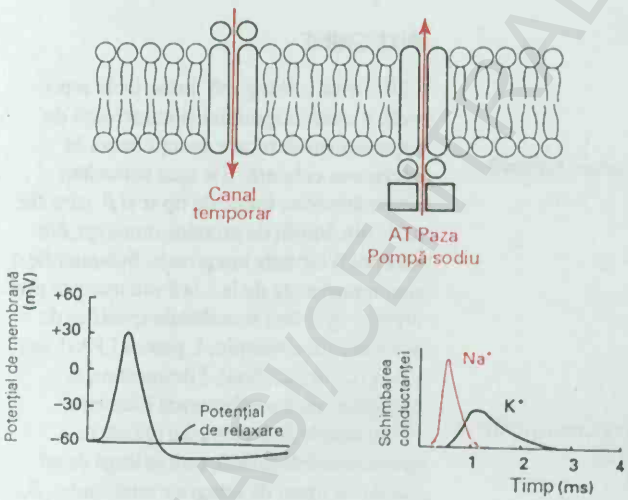


Fig. 15.49. Potențialul de acțiune rezultă dintr-un canal de transport și potențialul de membrană este restaurat prin pompa de sodiu.

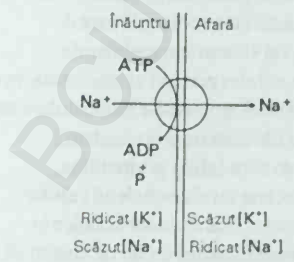


Fig. 15.50. Acțiunea pompei de sodiu.

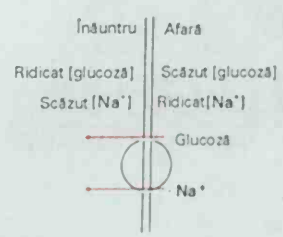


Fig. 15.51. Transportul glucozei este Na-dependent și reprezintă un sistem „symport".

prin tehnici similare celor folosite în cinetica enzimatică.

STRUCTURA PROTEINELOR DE TRANSPORT

Componentele unui sistem de transport pot conține toate sau doar unele din elementele arătate în figura 15.48. Acestea includ o poartă selectivă, indicată prin cercuri, un canal neselectiv prin membrană și un sistem de cuplare energetică reprezentat prin pătrate. Multe din aranjamentele posibile ale acestor sisteme pot avea loc; de exemplu poarta și/sau sistemul de cuplare energetică pot fi pe partea internă a membranei.

TRANSPORTUL IONIC

În axonul nervilor, potențialul de acțiune este reglat prin influxul de Na^+ printr-un canal cu poartă (barieră). K^+ este eliminat prin alte canale pentru a aduce potențialul de membrană la normal (figura 15.49). Concentrațiile ionice sunt refăcute în final printr-un sistem de transport membranar cunoscut ca pompă de sodiu (fig. 15.50). Aceasta implică acțiunea unei ATP-aze, care hidrolizează ATP când apare stimulare prin Na^+ și K^+. Asemenea tuturor enzimelor ce utilizează ATP, Mg^{2+} este necesar. Transportul poate fi, de asemenea, acționat de un gradient ionic, așa cum se vede în figura 15.51. În sistemul arătat, glucoza și Na^+ se deplasează în aceeași direcție. Termenul de „symport" este utilizat pentru a descrie un astfel de sistem și proteina este denumită „symporter". Când moleculele se mișcă în direcții opuse, se folosește termenul de „antiport", proteina fiind cunoscută sub numele de „antiporter".

ADEZIUNEA CELULARĂ

MOLECULE DE ADEZIUNE CELULARĂ

Suprafața externă a celulelor include molecule proteice care au funcția de legare a celulelor de alte celule sau de substraturi în rețeaua de proteine și poliglucide care înconjoară celulele în anumite țesuturi, numită generic ca matrice extracelulară (figura 15.52). Aceste molecule proteice sunt cunoscute sub termenul general de molecule de adeziune și există o varietate de tipuri. Două dintre cele mai importante clase sunt reprezentate așa cum se arată în figura 15.53, prin N-CAM (Neural Cell Adhesion Molecule - moleculă de adeziune celulară din sistemul nervos) și caderina E (Epithelial Ca^{2+}-dependent adhesion molecule - moleculă de adeziune epitelială Ca-dependentă). Astfel de molecule se recunosc și se leagă între ele (de exemplu,

BCU IAȘI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

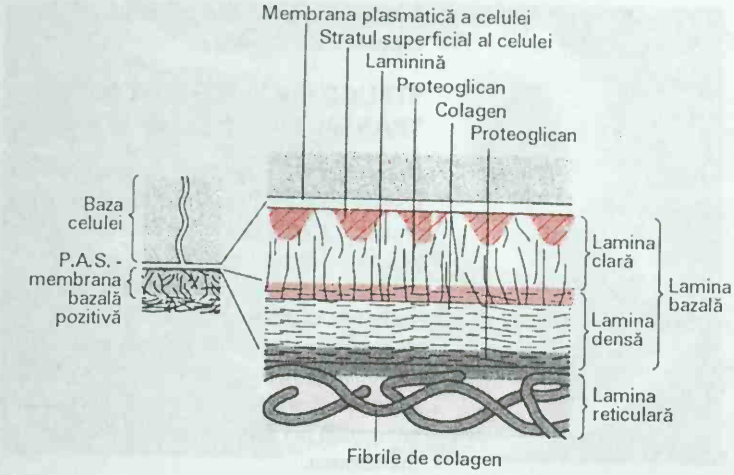


Fig. 15.52. Suprafețele exterioare ale celulelor sunt acoperite cu un strat de glicoproteine și membrana bazală conține colagen și alte proteine.

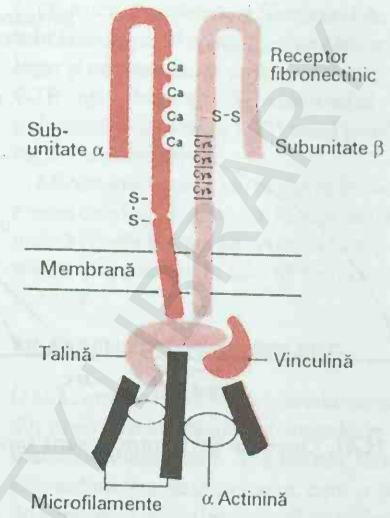


Fig. 15.55. Receptorul fibronectinei este o integrină importantă.

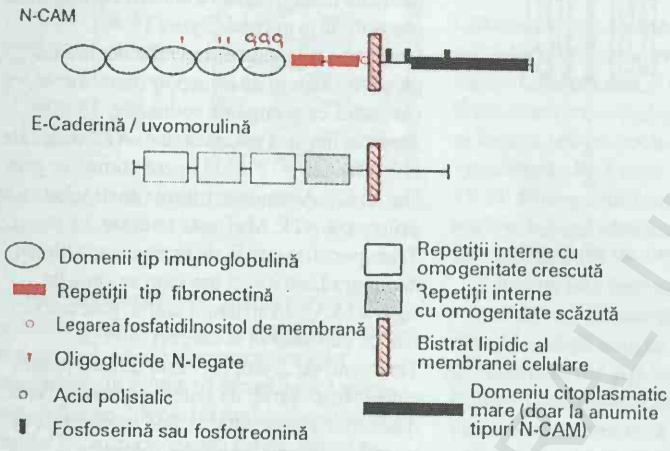


Fig. 15.53. Moleculele de adeziune celulară au rol nu numai în adeziunea celulară dar și în recunoaștere și comunicare intercelulară.

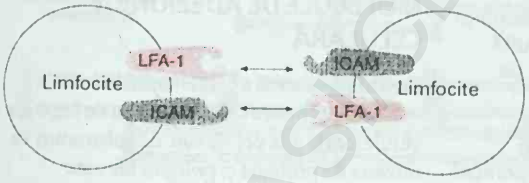


Fig. 15.54. Adeziunea poate fi homotropică sau heterotropică.

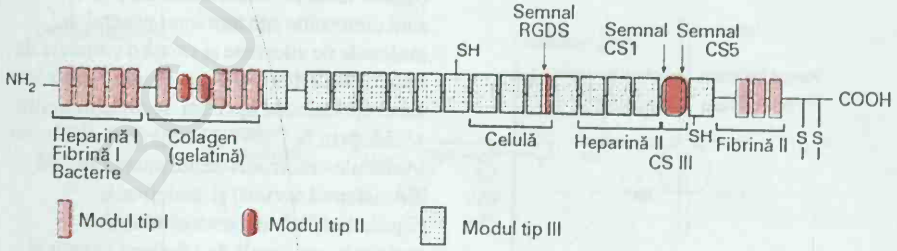


Fig. 15.56. Funcția multor domenii ale fibronectinei este deja cunoscută.

N-CAM cu N-CAM) când sunt prezente pe suprafața unor celule diferite. Aceasta este cunoscută ca legare homofilică. Alternativ, poate avea loc o legare heterofilică, așa cum este arătat în figura 15.54 pentru antigen-1 asociat funcției limfocitare LFA-1 (Lymphocyte Function associated Antigen-1) și molecula de adeziune intercelulară ICAM (Intercellular Adhesion Molecule) în limfocite.

INTEGRINE

LFA-1 este o integrină. Integrinele reprezintă o clasă răspândită și numeroasă de receptori celulari care funcționează în adeziunea celulară. Ele sunt subunități heterodimerice tipice de tip α și β, care fac parte din familii de proteine omologe, din care pot fi formate integrinele. Subunitățile α sunt numerotate de la 1 la 8 sau marcate prin litere ce se referă la molecule specifice de adeziune (de exemplu, L pentru LFA-1 sau v pentru vitronectină). Fibronectina, o glicoproteină mare formează filamente (2500 resturi de aminoacizi) găsite în matricea extracelulară, care se leagă de un număr de tipuri de integrine cum sunt $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$. Structura tipică a unei integrine este arătată în figura 15.55. Când o integrină interacționează cu o moleculă care o recunoaște, un sistem intracelular de informare a celulei privind aceste contacte se activează. Astfel, domeniile intracelulare ale receptorilor fibronectinei contactează proteine cum sunt talina și vinculina, proteine asociate cu citoscheletul celular prin intermediul filamentelor actinice și acestea formează astfel un fel de sistem de semnalizare, pe lângă celelalte funcții ale sale.

BUJ IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

FIBRONECTINA

Diferitele domenii de legare a fibronectinei sunt arătate în figura 15.56. Acestea sunt compuse din trei tipuri de unități repetitive omoloage, cunoscute ca module și denumite tipurile I, II și III. Astfel, cinci module de tip I aflate lângă capătul N-terminal formează un domeniu de legare a heparinei; alte domenii de legare sunt indicate în figură. Multe integrine recunosc motivul de secvență RGDX (unde X = S, V, A, T, C sau F). Așa-numitele semnale CS1 și CS5 în regiunea IIICS sunt semnale de adeziune celulară cu diferite specificități, CS1 față de celule limfoide și anumite celule tumorale, CS5 față de celule melanoma.

Modul în care integrinele pot funcționa este ilustrat prin implicarea lor în cicatrizarea rănilor. Astfel, integrina $\alpha_6\beta_4$ este o componentă a hemidesmozomului, o joncțiune celulară specializată care menține celulele epiteliale (keratinocitele) atașate de lamina bazală subadiacentă. În răni se exprimă integrina $\alpha_5\beta_1$, care este un receptor fibronectinic. Celulele implicate în cicatrizarea rănilor exprimă fibronectina și keratinocitele migrează pe suprafața acesteia, acoperind rana (fig. 15.57).

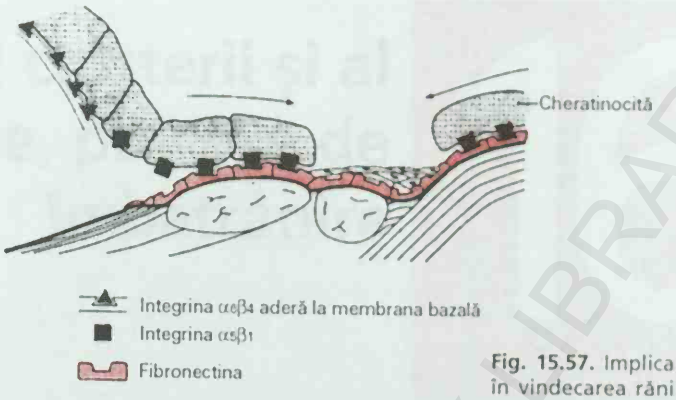


Fig. 15.57. Implicarea integrinelor în vindecarea rănilor.

B.C.U. "M. EMINESCU" IAȘI

BCU IAȘI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Controlul creşterii şi al morţii celulare, procese de îmbătrânire

16

Este discutată iniţial semnificaţia bioinformaticii. Nu numai creşterea celulară, dar în multe cazuri şi moartea celulară este un proces controlat. Moartea celulară controlată este denumită apoptoză, în contrast cu moartea indusă de toxine sau alte leziuni, denumită necroză. Caspazele au rol important în apoptoză. Anumite gene cunoscute ca gene supresoare tumorale, din care una are ca produs p53, sunt implicate în prevenirea creşterii necontrolate. Se crede că telomerazele joacă un rol important în procesul îmbătrânirii. Factorii de creştere şi receptorii lor activează cascada de protein kinaze care sunt implicate în stimularea creşterii. Este discutat rolul acestor sisteme în geneza tumorilor.

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

INTRODUCERE

Până acum cartea a descris structura şi metabolismul componentelor chimice din celulele vii. În acest ultim capitol, sunt luate în considerare anumite direcţii de interes deosebit în viitorul apropiat. Rezultatele recente privind înţelegerea procesului fundamental din cancer demonstrează acest lucru. Înainte de toate, va fi descrisă o disciplină de interes cu efect profund în cercetarea ştiinţelor biologice: bioinformatica.

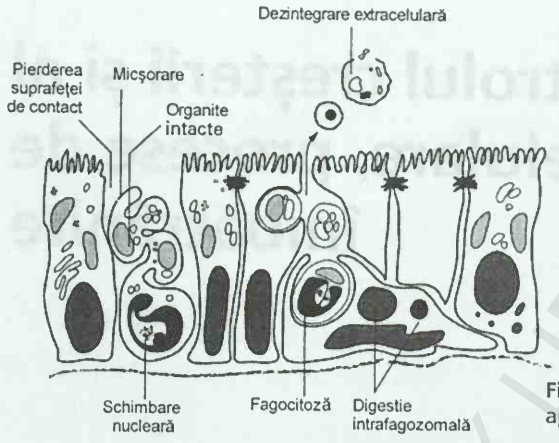


Fig. 16.1. Schema evenimentelor apoptotice dintr-un strat epitelial.

BIOINFORMATICA

Colectarea datelor şi stabilirea structurii genelor din microorganisme a fost denumită generic bioinformatică. Nu mult timp după publicarea acestui text este probabil ca să fie cunoscută structura completă a genomului uman. Unii apreciază că bioinformatica va revoluţiona practica medicală, alţii au o viziune mai precaută. În orice caz, cunoaşterea structurii genice are deja beneficii deosebite, care vor fi accentuate prin definitivarea acestui proiect.

Genomul uman are aproximativ 3 miliarde de nucleotide. S-a presupus existenţa a 100 000 gene, dar până în prezent s-au caracterizat şi se cunoaşte funcţia a maximum 10 000, de aceea o sarcină dificilă în viitor va fi identificarea a noi gene şi determinarea funcţiilor lor. Recenta completare a secvenţei genomice a nematodului *Caenorhabditis elegans* – primul organism multicelular analizat pe această cale – arată că genomul conţine predominant introni necodificatori, uneori cu lungime de multe kilobaze.

Funcţia genelor în bolile ereditare poate fi găsită uneori prin genetică inversă (p. 48); aceasta a fost folosită cu succes în analiza fibrozei chistice (mucoviscidozei). Pentru a recapitula, gena a fost identificată şi structura proteinei exprimate a fost comparată cu a altor proteine cu funcţie cunoscută. Asemenea comparaţii nu trebuie limitate la proteine de la aceleaşi specii, de aceea e clar că genele care exprimă proteine cu funcţii similare sunt similare în structură, indiferent că provin de la o drojdie sau un nematod. Un proces similar poate fi aplicat la domenii proteice caracteristice pentru funcţiile enzimelor, de exemplu domeniile SH (p. 193).

Fibroza chistică e un exemplu de boală ereditară care provine dintr-un defect monogenic. Asemenea boli sunt cunoscute ca boli mendeliene, dar sunt multe boli ca hipertensiunea, cancerul, astmul şi diabetul care sunt tot mai bine înţelese din punct de vedere al susceptibilităţii genetice diferenţiate provenind de la o „cooperare" între genele unui individ. Să sperăm că în viitor va fi posibilă consilierea unui pacient asupra procedurilor de urmat prin cunoaşterea structurii ADN propriu. Pentru cei susceptibili la diabet, recomandarea include verificarea dietei pentru a încerca evitarea prezenţei unui surplus de greutate. Pentru cei cu predispoziţie genetică la cancer de sân, ar putea fi recomandată profilactic administrarea de tamoxifen. Din nefericire, companiile de asigurare vor fi mai pregătite să „interpreteze" în folosul propriu datele asupra sănătăţii şi a speranţei de viaţă a clienţilor.

În boala Huntington a fost identificată o genă care exprimă o proteină, huntingtina, cu funcţie necunoscută. În aceste situaţii apare o problemă etică: deşi se poate spune pacientului riscul moştenirii bolii, în fapt în prezent nu există tratament pentru această boală.

Industria farmaceutică este entuziastă privind utilizarea bioinformaticii şi a graficii pe calculator pentru a face designul unor potenţiale medicamente care să interacţioneze cu situsurile active ale unei enzime care trebuie să fie inhibată. Recent s-a obţinut cu succes inhibarea proteazei esenţiale pentru propagarea HIV-1 (p. 21) şi a neuraminidazei virusului gripei. Această tehnică este, de asemenea, foarte folositoare în modificarea compuşilor cu Pb care sunt cunoscuţi ca fiind inhibitori enzimatici dar nu sunt agenţi farmaceutici. Asemenea compuşi cu plumb pot fi substanţe de sinteză care au dovedit toxicitate dar şi substanţe naturale de origine vegetală. Se pare, prin urmare că s-a ajuns la epoca „descoperirii medicamentului raţional".

APOPTOZA

În domeniul cercetării celulelor la nivel molecular, recent s-au amplificat studiile privind controlul morţii celulare, care a fost denumită apoptoză sau moarte celulară programată. Principalele caracteristici sunt arătate în figura 16.1. Celulele care mor îşi pierd suprafaţa de contact cu celulele vecine şi se condensează, dar îşi reţin organitele. Condensarea cromatinei are loc cu fragmentarea în final a nucleului şi citoplasmei în corpii apoptotici mulţi şi mici. Aceşti corpi pot fi pierduţi de pe suprafaţa epitelială şi suferă degenerare extracelulară sau pot fi fagocitaţi de către vecini sau macrofage şi suferă digestie fagozomală. Termenul de apoptoză poate include toate aceste forme de moarte celulară normală sau patologică, incluzând activitatea reglatoare care este esenţială în embriogeneză şi homeostazie. Definirea apoptozei exclude moartea celulară rezultată din intoxicare sau hipoxie, numită mai corect, necroză. În necroză celulele se umflă şi „explodează" şi se declanşează un răspuns inflamator dăunător. În corpul uman, milioane de celule mor în fiecare minut; noi ne menţinem dimensiunea constantă pentru că diviziunea celulară contrabalansează moartea celulară. Corpusculii apoptotici sunt formaţi ca rezultat al acţiunii unui grup de enzime numite caspaze („caspase"), toate având cisterna în situsul activ şi clivează proteinele ţintă la nivelul acidului aspartic (numele derivă din cisteină aspartază). Caspazele sunt produse ca zimogene precursoare inactive (vezi p. 142 şi figura 16.2), procaspaze, şi sunt activate prin scindarea la nivelul acidului aspartic, eliberând o subunitate mare şi o subunitate mică, care se asociază în tetrameri

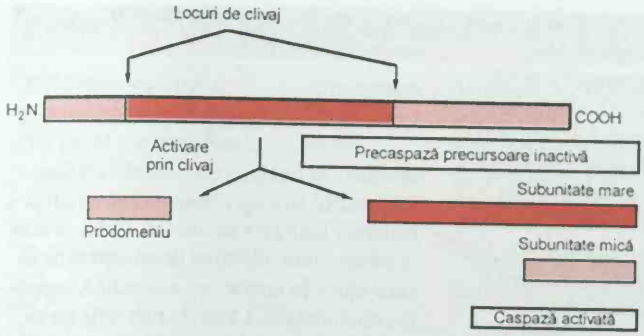


Fig. 16.2. Activarea unei caspaze.

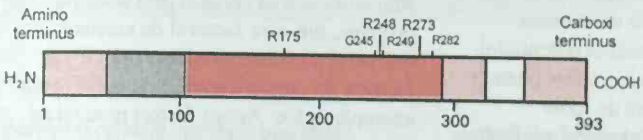


Fig. 16.3. Principalele domenii funcţionale ale proteinei p53.

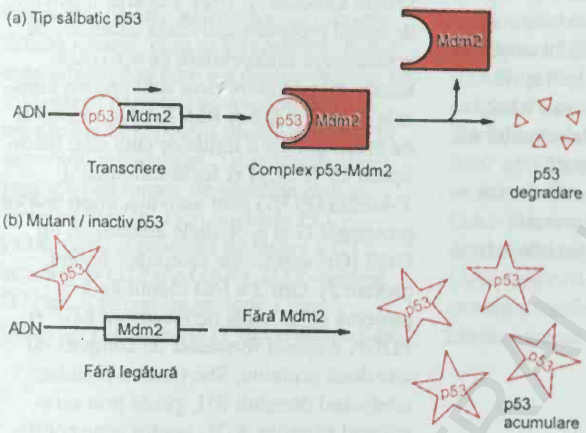


Fig. 16.4. Acţiunea proteinei p53 în celule tumorale.

$\alpha_2\beta_2$ pentru a forma enzima activă. La om se cunosc 10 caspaze diferite. În apoptoză, caspazele sunt activate într-o cascadă proteolitică amplificată (p. 68) scindându-se una pe alta, în ordine. Procaspazele sunt produse continuu de către celule sănătoase, astfel maşina de „sinucidere" este mereu în funcţie; pentru activarea sa este necesar factorul declanşator („trigger"). Procaspazele pot deveni activate dacă o celulă este stresată sau deteriorată şi în special dacă ADN-ul său este degradat (afectat). Când mitocondriile sunt lezate, de exemplu de un medicament toxic, ei eliberează citocrom *c*. Acesta se leagă la proteina adaptor Apaf-1 şi activează o procaspază.

APOPTOZA ŞI CANCERUL

Se ştie de mult că o diferenţă majoră între celulele normale şi canceroase este aceea că celulele normale au o viaţă limitată în timp ce celulele canceroase sunt nemuritoare. Am arătat anterior importanţa practică a acestui fenomen în obţinerea anticorpilor monoclonali în care celulele producătoare de anticorpi sunt fuzionate cu celule nemuritoare de mielom. La baza explicării diferenţelor între celulele normale şi celulele canceroase stă procesul de diferenţiere.

Celulele normale pot fi transformate de oncogene şi acest proces poate fi prevenit prin produse ale altor gene cunoscute ca gene tumor-supresoare. Una dintre aceste gene este p53; aceasta produce o fosfoproteină nucleară formată din 393 resturi de aminoacizi dintr-o care leagă ADN şi activează transcrierea la nivelul unor promotori. În aproximativ jumătate din cazurile de cancer uman, p53 este inactivată prin mutaţie, ceea ce induce creşterea necontrolată a celulelor. Majoritatea cazurilor de sindrom familial Li-Fraumeni sunt cauzate de mutaţii ale genei p53 în linia germinală. O altă dovadă crucială este viteza mare de dezvoltare a tumorilor la şoarecele transgenic p53 knockout (şoarece care nu are gena p53).

Proteina p53 conţine patru module funcţionale principale, aşa cum se prezintă în figura 16.3. Aminoacizii 1-42 conţin un domeniu acid de activare a transcrierii care mediază interacţiunile proteină-proteină. Regiunea centrală (resturile 102-292) este domeniul secvenţial specific de legare a secvenţelor de ADN, cel mai frecvent cu mutaţii în celulele canceroase. p53 poate lega ADN ca tetramer şi oligomerizarea este mediată de un domeniu situat între resturile 324 şi 350. Capătul C-terminal (367-393) leagă nespecific acizii nucleici.

Proteina p53 determină oprirea creşterii celulare prin activare directă a transcrierii unui grup de gene ţintă, în special cele implicate în ciclul celular (p. 22). Stabilitatea metabolică a proteinei p53 are efect crucial asupra cantităţii de proteină găsită în celulele normale şi canceroase. Timpul de înjumătăţire creşte semnificativ după ce celulele sunt expuse la diferite semnale de stres incluzând deteriorarea ADN, hipoxia şi şocul termic. Prezenţa proteinei p53 este esenţială în determinarea răspunsului întregului organism la radiaţie. Prin urmare avem o explicaţie raţională a efectelor benefice ale terapiei prin iradiere şi ale chemoterapiei, ambele inducând leziuni ale ADN şi în consecinţă stimularea producţiei de p53.

În plus faţă de abilitatea proteinei p53 de a cauza inhibarea creşterii, ea influenţează de asemenea apoptoza. Rolul fundamental îl are proteina Mdm2, o fosfoproteină nucleară cu 491 resturi de aminoacizi (la om) care conţine un domeniu de legare a p53 la capătul N-terminal. O mică regiune a capătului N-terminal al p53 favorizează o interacţiune strânsă proteină-proteină cu un domeniu mic „buzunar" („pocket") hidrofob N-terminal în Mdm2 (vezi figura 16.4 [a]). Când p53 este legată de Mdm2, ea devine ţintă a degradării prin calea proteazomică dependentă de ubiquitină (p.45). Transcrierea Mdm2 este dependentă de p53. În consecinţă, p53 dirijează transcrierea produsului genic care va ţinti chiar autodistrugerea sa. În celulele tumorale ce nu conţin Mdm2, p53 va fi stabilă. În celule tumorale cu o mutantă p53, factorul normal de transcriere p53 este absent (figura 16.4[b]). Este posibil ca activarea prin stres a p53 să aibă loc prin întreruperea degradării p53 pe calea Mdm2.

O altă familie de proteine care are rol major în controlul apoptozei este denumită Bcl-2, din care 15 diferite proteine au fost identificate la mamifere. Nici una din aceste proteine nu suprimă apoptoza prin legare directă de caspaze, dar o fac printr-o varietate de metode, una din ele fiind aceea de a inhiba eliberarea citocrom c din mitocondrii. Bcl-2 este legată de membrana externă a mitocondriilor.

ROMANIAN CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

O extensie a conceptului de imortalitate celulară este fenomenul de îmbătrânire, care în esență este exprimat prin moartea întregului organism, în loc de moartea unei singure celule.

TELOMERI ȘI TELOMERAZE

Lanțul discontinuu de ADN se sintetizează prin intermediul unei primaze care produce un ARN amorsă (primer) pentru ADN polimeraza (p. 24). Amorsa este apoi eliminată în mod normal, dar în continuare nu se poate sintetiza secvența de lanț complementar față de o regiune mică de la capătul cromozomului (care este cel puțin atât de mare cât este ARN amorsă). Astfel, prin diviziune celulară continuă, secvența de la capetele cromozomilor liniari este pierdută. Apar două întrebări, prima, de ce asemenea defecte nu sunt recunoscute ca fiind o deteriorare a ADN și a doua, cum se poate preveni scurtarea lanțului. Ultima este cunoscută și ca „problema replicării terminale". Răspunsul implică o cunoaștere a rolului telomerilor, structuri specializate aflate la capetele cromozomilor liniari. În liniile germinale, telomerii sunt menținuți prin adiția compensatoare a secvențelor repetitive TTAGGG la capetele cromozomilor. Aceste secvențe sunt sintetizate de către o enzimă denumită telomerază (figura 16.5). Telomeraza este o ribonucleoproteină în care ARN și componentele proteice sunt ambele esențiale pentru sinteza ADN telomeric. Telomeraza generează repetiții – tandem ale secvențelor scurte codificate de telomeraza ARN din complexul telomerazei. De exemplu, cromozomii vertebratelor au la capăt copii multiple ale secvenței C_3TA_2/T_2AG_3. După elongarea catenei 3', catalizată de telomerază, o ADN polimerază convențională probabil sintetizează lanțul complementar. Majoritatea celulelor somatice umane și unele de la șoarece nu exprimă telomeraza la nivele detectabile și prin urmare diviziunea celulară induce scurtarea telomerilor. În schimb, majoritatea tumorilor umane exprimă telomeraza. Aceasta conduce la ipoteza că potențialul replicativ al celulelor de mamifere poate fi determinat prin cantitatea de ADN telomeric. Bazată pe acest model, abilitatea de exprimare a telomerazei și în consecință de menținere a ADN telomeric ar fi o etapă crucială în tumorigeneză. Această ipoteză a fost susținută de experimente în care exprimarea ectopică a subunităților catalitice ale holoenzimei telomerazice determină celulele să se multiplice continuu. Acum este clar de altfel că scurtarea telomerilor nu este singurul stimul care provoacă îmbătrânirea; controlul ciclului celular are bineînțeles un rol aparte. Prin urmare, telomeraza este o temă de studiu intens în cercetarea în cancer și poate avea un posibil rol în chimioterapie.

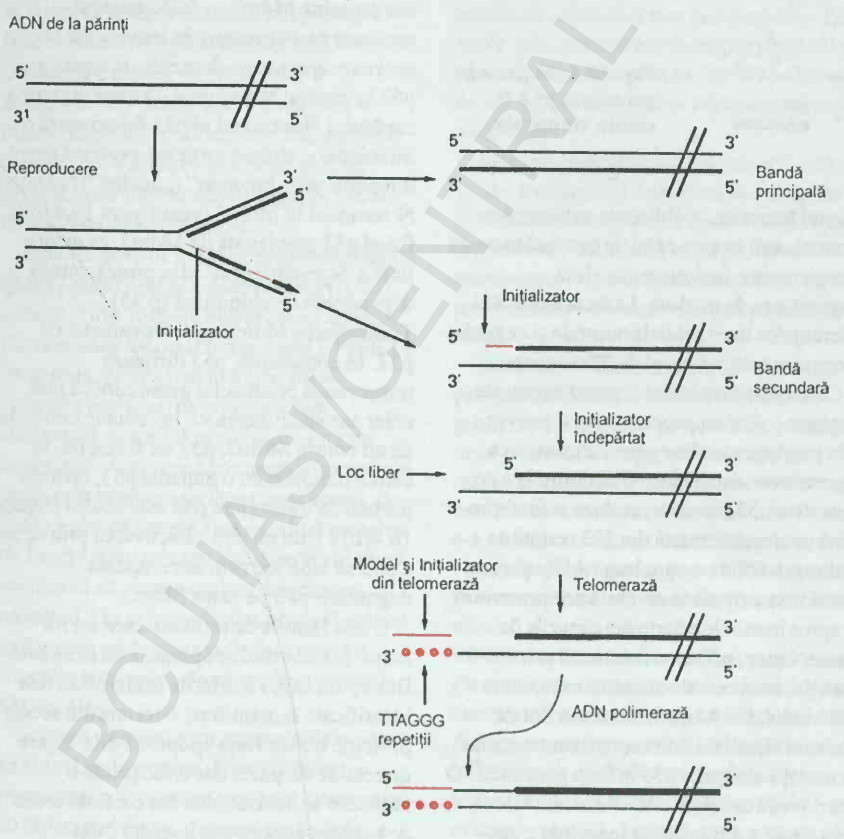


Fig. 16.5. Rolul telomerazei.

CONTROLUL CREȘTERII CELULARE

În situații normale, creșterea celulară este sub control strict și creșterea nerestrictivă a celulelor tumorale nu are loc. Celulele normale se supun inhibiției de contact: atunci când ajung în contact cu alte celule, creșterea este inhibată. Celulele tumorale nu au astfel de restricții în creștere. Controlul creșterii celulare a fost studiat în detaliu utilizând culturi de celule. Asemenea celule sunt stimulate să crească prin anumite proteine, din care factorul de creștere derivat din plăcuțe sangvine (PDGF) și factorul de creștere epidermic (EGF) sunt exemple tipice. Acești factori proteici de creștere se leagă de receptorii suprafeței celulare care traversează membrana și care au un domeniu citosolic cu activitate tirozin kinazică (p.192). Legarea liganzilor de acești receptori activează sistemele de semnalizare intracelulară ce activează kinaze intracelulare cum sunt protein kinazele A și C și Src și Raf. În plus, enzimele de metabolizare a lipidelor cum sunt fosfolipaza Cγ (PLCγ) și fosfatidilinozitol 3'-kinaza (PI3K) sunt activate, împreună cu proteinele G și proteinele adaptor de tip Grb2 (Growth factor receptor – bound protein 2). Grb 2 a fost identificată ca proteină ce se leagă de receptorii EGF și PDGF. Aceasta formează un complex cu alte două proteine, Shc (pentru proteine conținând domenii SH, găsite prin screeningul băncilor ADN pentru gene codificând SH2) și proteine Sos. Proteinele Sos au fost inițial găsite în mutante Drosophila denumite „Son and Sevenless"[1]. S-a demonstrat că această proteină activează Ras prin stimularea eliberării GDP. Este activată prin Grb2 – Shc.

Multe din proteinele implicate în stimularea creșterii au fost descoperite ca rezultat al studiilor virusurilor oncogene (adică provocatoare de tumori). S-a găsit că genele responsabile de formarea cancerului sunt omologi celulari ai oncogenelor virale (v) și prin urmare au fost denumite oncogene celulare (c). Termenul de protooncogenă descrie oncogene celulare care nu posedă potențial de transformare în celule normale; în această situație, aceste gene codifică proteine implicate în creșterea și diferențierea celulelor normale: factori de creștere, receptori pentru factori de creștere etc. Tabelul 16.1 prezintă un număr de produși oncogenici și modul prin care ei diferă de partenerii lor celulari. Mutațiile care dau naștere la oncogene determină exprimarea proteinelor care nu sunt reglate prin mecanisme de control

BCU IAȘI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 16.1. Tipuri de produşi oncogenici şi originea lor

Originea virusului	Oncogene	Mutaţii în oncogene
Virus de sarcom Rous	v-*src*	Schimbare a resturilor la C terminal, ca rezultat, fosforilarea tirozinei (importantă în reglare) nu are loc
Erytroblastoză aviană	v-*erbB*	Omolog cu receptorul EGF dar fără domenii, rezultând o proteină activă
Sarcoma şobolan	v-*ras*	Mutaţia punctiformă determină incapacitatea *ras* de a hidroliza GTP legat, astfel rămânând activă în mod anormal

normal şi celulele infectate sunt astfel stimulate să prolifereze într-un mod necontrolat.

Figura 16.6 subliniază câteva din interacţiunile care au loc când un receptor tirozin kinazic, cum ar fi receptorul PDGF este activat. Aşa cum s-a descris anterior (p. 192) aceşti receptori se autofosforilează, eveniment tipic pentru tirozin-proteine în domeniul intracelular. Tirozinfosfaţii pot lega apoi un număr de proteine care au domenii SH2 (p. 193), inclusiv PLCγ, PI3K, Grb2 şi proteina de legare a GTP, activată de GTPaze GAP („GTP-binding GTPase – activating protein"), care cauzează eliberarea GTP din proteina Ras, astfel inactivând-o. Ca rezultat, proteinele care leagă tirozinfosfaţii sunt şi ele activate prin fosforilare, se disociază de receptor şi catalizează reacţii care fac parte din mecanismele de semnalizare în aval. De exemplu, PLCγ formează diacilglicerol (DAG) şi IP_3, ultimul cauzând eliberarea calciului intracelular care, în combinaţie cu DAG, activează PKC (protein kinaza C). PKC apoi fosforilează şi activează în aval un număr de serin/treonin kinaze.

Grb2-Shc leagă şi activează Ras, care apoi determină activarea Raf, care are activitate MAP kinazică în succesiune de 3, de exemplu catalizează fosforilarea MAP kinaz- kinazei (MAPkinaza „Mitogen Activated Protein Kinase" este protein kinaza activată de substanţe mitogene în continuare, MAP kinaza fosforilează factori de transcriere care se leagă de promotori în felule acesta activând exprimarea genelor care iniţiază proliferarea celulară.

PKA (protein kinaza A) este implicată într-o altă cale a procesului de semnalizare, determinând fosforilarea CREB (vezi p. 190).

O altă protein kinază implicată în controlul creşterii este cunoscută ca protein kinaza B. Aceasta a fost iniţial cunoscută ca Akt şi este produsul oncogenei de transformare v-akt a retrovirusului AKT8. Ulterior a fost re-numită protein kinaza B (PKB) prin analogie cu PKA şi PKC. Are un domeniu ce leagă produşii kinazei PI3', cum ar fi PtdIns(3,4)P_2 şi PtdIns (3,4,5)P_3. Aceasta conduce la activarea sa prin fosforilare de către alte protein kinaze şi apoi acţionează ca o serin/treonin-kinază şi fosforilează alte proteine. Aceste proteine includ şi c-Jun, care formează un factor complex de transcriere cunoscut sub numele de AP1. PKB este, de asemenea, implicat în acţiunea insulinei în controlul glicogen-sintetazei. Aşa cum s-a arătat în figura 15.14, activarea receptorului insulinic duce la activarea PI3'-kinazei. Aceasta la rândul ei, determină activarea PKB, care apoi fosforilează GSK3 (figura 13.4), pe o cale ce duce la inactivare. Deşi multe detalii lipsesc în prezent, PKB este o enzimă care face obiectul unor investigaţii active.

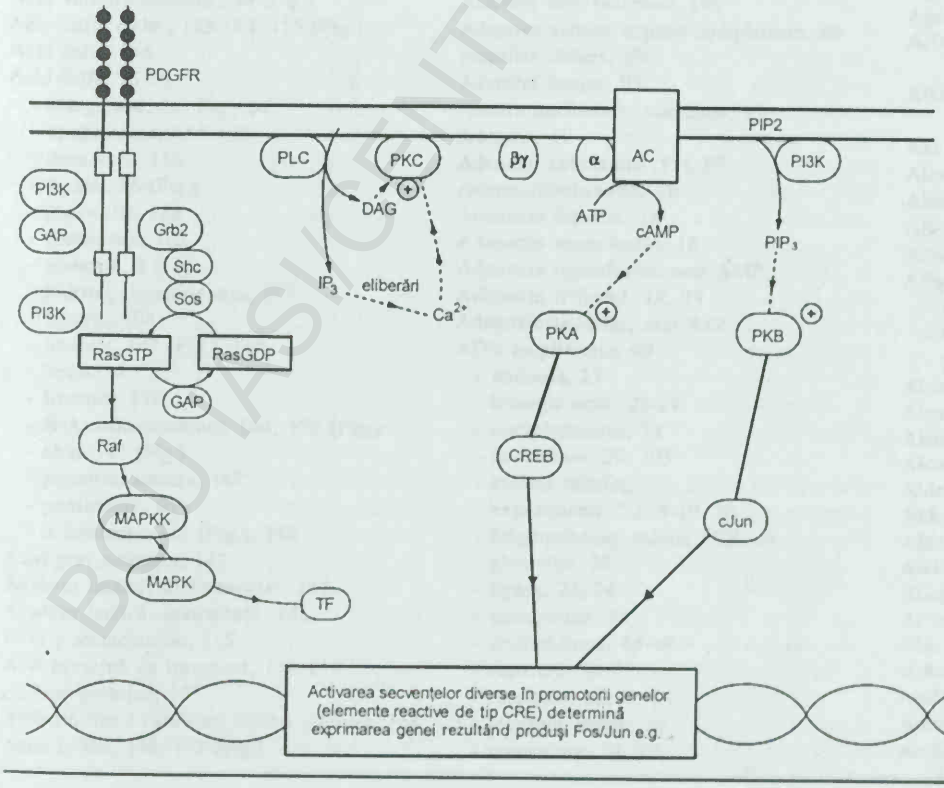


Fig. 16.6. Semnalizarea prin protein kinaze în stimularea creşterii celulare.

În ciuda unor stimulări continue prin unul sau altul dintre factorii de creştere, celulele netransformate revin la faza dormantă şi încetează să prolifereze.

ONCOGENELE ŞI CANCERUL

Deşi oncogenele sunt cunoscute a fi agenţi activi ai virusurilor oncogenice, rolul lor în alte forme de cancer este neclar. S-a demonstrat că supraexprimarea susţinută a unor protooncogene transformă anumite tipuri celulare şi, în anumite tipuri de cancer, nivelul unor anumite protooncogene a fost găsit ca fiind foarte înalt. Cu toate acestea, asocierea între protooncogene şi cancer rămâne neclară.

* Mutanta „sevenless" este denumită astfel pentru că implică o mutaţie într-o genă ce face parte dintr-un sistem de diferenţiere a fotoreceptorilor R7 în *Drosophila*. Produsul Sev este un receptor pentru un semnal extracelular; el are activitate tirozin-kinazică şi aparţine familiei de receptori insulinici. Mutaţiile aferente au fost denumite ca parte a acestei familii. De exemplu, boss (bride of sevenless) codifică o proteină exprimată de celulele fotoreceptorului R8 care este internalizat prin legare de Sev. Gena-fiu „Son of sevenless" (Sos) a fost identificată ca genă ce codifică o proteină de eliberare a nucleotidelor guanilice necesare receptorului Sev tirozin-kinazic pentru activarea Ras. Sistemele implicate în transmiterea semnalului de la receptorul tirozinkinazic la nucleu se găsesc într-un spectru larg de organisme, de la speciile unicelulare până la om.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Index

A
α-Amanitina, 29
Absorbţie fier, 64
Absorbţie, 143, 162 (Fig.)
Acetaldehid dehidrogenaza mitocondrială, 90
Acetali, 100
Acetil CoA carboxilaza, 168
Acetil CoA, 95
Acetiltransferaze, 22
Acetoacetat,137
Acetoacetil CoA, 137-138
Acetona,137
Aciclovir, 29
Acid ascorbic, 97, 131-134
- efect asupra absorbţiei fierului, 64
- şi deficienţa glutationului, 132
Acid aspartic, 8 (Fig.)
- hialuronic, 102
- sialic (N-acetilneuraminic
- stearic, 147 (Fig.), 104, 179 (Fig.)
Acid aurintricarboxilic, 36 (Fig.)
Acid citric ciclu , 123-124, 125 (Fig.)
Acid colic, 156
Acid folic, 95-96
- antagonişti, 25; Fig., 26
- apoproteine, 154-155
- deoxicolic 156
- fuzidic, 36 (Fig.)
- glicocolic, 156
- glucuronic, 103
- glutamic, 8 (Fig)
- hidroxi eicosatrienoic, 177
- hipuric, 104
- linoleic, 147 (Fig.), 148
- lipoic 94
- litocolic 156
- N-Acetilneuraminic, 104, 179 (Fig.)
- oleic 147 (Fig.)
- palmitic, sinteza, 147
- pantotenic, 95
- α-linolenic, 147 (Fig.), 148
Acid gras sintetaza, 147
Acidoza lactică, dicloroacetat, 167
Acidoza lactică, intoleranţă, 143
Acid γ-aminobutiric, 115
Acil proteină de transport, 146-147
Acilare proteine, 185
Acilcarnitina / carnitina, sistem antiport, 168
Acizi biliari, 156, 157 (Fig.)
Acizi esenţiali, 148
Acizi graşi, 147-148, 153-157
- la peşti, la păsări 160
- liberi, toleranţa la glucoză, 138
- nesaturaţi, 147-148
- polinesaturaţi, 148, 159-160
- semnale fibronectină, 199
- simbol, 147
- sinteză şi reglare, 168-169
- sinteză, 31, 42-43
Acizi nucleici, 18, 19
Acizi nucleici, 18-20 (Tabel)
Acizi nucleici, 19-20
ACTH (vezi hormon adrenocorticotropic), 179
Actină, 72, 73
- în citoschelet, 194-196
Actinomicina D, în transcrierea ADN, 28, 29
Actinomiozina,71
Activare 32, 205
Activare genică, 166
Activare prin receptori, 189
Adaptive sistem, acţiune complement, 69
Adenilat ciclaza, 85
Adenilat kinaza, 93
Adenin nucleotide, coenzime, 93
Adenina, 19
Adenozil cobalamin (5'-), 97
Adenozilmetionina,110
Adenozin difosfat, 18
Adenozin monofosfat, 18
Adenozin monofosfat, *vezi* AMP
Adenozin trifosfat, 18, 93
Adenozin trifosfat, *vezi* ATP
ADN amplificare, 49
- antisens, 27
- biologic activ, 22-24
- complementar, 24
- denaturare, 20, 203
- excizia bazelor, 27
- experimente, 22, 9-10, 80
- fingerprinting, reacţie PCR, 48
- glicozilat, 27
- ligaza, 23, 24
- polimeraza, 24
- recombinant, 45-49
- reparare, 26-27
- replicare, 22, 23-24
- secvenţe, deleţii, 26
- transcriere, 28, 29
ADN polimeraze, 22-24
- Klenow polimeraza, 49
- metode de secvenţializare Sanger, 26
- termostabile, 27
ADN, 18-20
ADN, dublu helix, 18-19
ADN, linkeri, 49
ADN, perechi de baze, 20
ADN-polimeraze, 22-24
AdoHci, *vezi* Adenosilhomocistein α-cetoacid dehidrogenaza complecşi, 94
AdoMet *vezi* S-adenosilmetionină
α-Lactalbumina, 59
ADP, 128-130
ADP, *vezi* Adenin nucleotide coenzime ca α-proteine, 181
ADP-ribozilare, proteine G, 189, 190
Adrenalină, 113
Adrenergic, receptor, 186
Adsorbţie izotermă, legare, 188 (Fig.)
Agenţi chelatare, şi fier, 64 C3, 69
Agenţi decuplare fosforilare oxidativă, 145
AIDS, *vezi* Virus de Imunodeficienţă Umană (HIV), 17
AIDS, Virus de Imunodeficienţă Umană (vezi HIV), 17
Akt (proteinkinaza B), 205, 17
Alanin transaminază, 81 (Tabel)
Alanina, 8 (Fig.)
Albinism, 110-111
Albumina, definiţie, 62
Albumină serică,
- punct izoelectric, 11 (Tabel)
- în electrofereză, 62
- proprietăţi, 63
Alcaptonuria, 110
Alcohol dehidrogenaza citosolică, 90
Alcohol dehidrogenaze, variante alelice, 65
Alcoolism, şi γ -glutamiltransferaza, 80-81
Aldolaza, 122
Aldosteron, 178 (Fig.), 179
Aldoze, 100
Alelic, variante, 92, 106
Allopurinol, 26
Allosteric, enzime, 85-87
Alu, familie ADN, 49
α-Amanitina, 29
Amfetamina, 113
Amfetamine, 113
Amfoteric, compuşi, 9

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Amidon, 102
Amilaze, 81 (Tabel), 142-143
Amilopectina, 102
Amiloza, 102
Aminoacizi, 8-10, 109, 127, 129
- activare, 32
- atașare, 32-33
- biosinteza, 109-110
- coduri cu o literă, 8 (Fig.), 31 (Tabel)
- esențiali, 108-109 (tabel)
- în sinteza proteică, 30-32
- secvențe în proteine, 13-14
Aminoglucide, 101
Aminolevulinat (5'-), 115
Aminotransferaze, 106
Amoniac, 106-108
Amoniu, ion, 106
AMP ciclic, 85
AMP, 18
AMP, 93
Amplificare, 49
Androgeni, 179
Androstendiona, 178 (fig), 179
Anemia pernicioasă, 97
Angiotensine, 179
Angiotensinogen, 179
Anhidrid fosfat, în glicoliză, 122
Ankirina, 194
Anomeri, 100
Antagoniști, 42
Antibiotice, rezistență, 45, 46 (Fig.), 47
Anticodoni, 33
Anticorpi antinucleari, în *Lupus sistemic* (Fig.) 38
Anticorpi, 38-39, 65-66
Antidiuretic hormon (vasopresina), 16
Antiestrogeni, 42
Antigeni, 65
Antigen-I, 198
Antimetaboliți, biosinteza ADN, 29
Antimicina, decuplare, lanț de transport electronic, 197
Antiport, sistem, 130, 197
Anti-progestine, 42
Antitrombina, 58
Antivirale, medicamente, 29
Antropologie moleculară, 44
Aparat Golgi, 2, 5 (Fig.), 43, 197-198 *vezi* Peroxizi
Aparat Golgi, 43
Apo B-48, 34, 152
Apoferitina, 64, 65
Apolare, legături în proteine, 12
Apolipoproteina B, 100, 44
Apolipoproteine, 148-149,152
- formare lipoproteine de densitate înaltă, 153
- receptori, 154-155, 186
- tipuri și funcții, 153 (tabel)
Apoproteine și fosforilaz kinaze, 163
Apoptoza, 202-204
Arahidonic acid, 147 (Fig.), 172
Arbore, viață, 2
Archea, 2
Arginaza, deficiența, 108 (Tabel)
Arginin vasopresina, 16 (Fig.)
Arginina, 8 (Fig.), 13, 192 (Fig.)
Argininosuccinat, în ciclu ureic, 108
ARN Antisens, 30
ARN polimeraze, 27-28, 39-40
ARN transfer, 18, 33-34
ARN, 18
- atașare aminoacizi, 32-53
Arnital, 127
ARNm, editare, 34
ARNt inițiator, 35
ARNt, producție în, 68-69
ARNt, structura, 33, 34 (Fig.)
ARNt, *vezi* ARN Transfer
Aromatic, aminoacid, 112-113
Asparagina, 8 (Fig.)
Aspartat transaminaza, în infarct miocardic, 80
Aspartat, 106
- din transaminare, 106
- în degradarea proteică, 106
Aspirina, acțiune 177
Ataxia Friedreich, 48 (Tabel)
Ateroscleroza, 158
ATP, 18, 93
- din ADP, 128-130
- în glicoliză, 123
ATP, 93
- coduri cu 3 litere, 8 (Fig.) 31 (Tabel)
- hidroliza alcalină, 18
- în biosinteza ADN, 23, 24
- virusuri, 28-29
ATPaza pompă sodiu, antibiotice, 197
ATPaza, complex, în mitochondrii, 128, 129
AUG, codon în lanț initiere, 33
Autofosforilare, 187
Autoliza, 45
Axiale, legături în glucide, 101
Axon, 72 (Fig.), 73
Axon,72 (Fig.), 73
Azauracil, efect în metabolism nucleotidic, 25, 188
Azauracil, metabolism nucleotide, (Fig.), 25, 205
Azauracil, nucleotide, metabolism, 25, 205
Azeserina, metabolism nucleotide, 25
AZT (zidovudina), 29

B
Bacteriofag T2, acizi nucleici, 19 (Tabel)
B-ADN, 19
Banda proteică 4.1., 194
Barbiturați, enzima de inducere, 81
Bcl-2 proteina, 203
Beri-beri, 94
Betaina, 110
Betametazona, 179
Bila, 156 (Tabel)
Biliară, obstrucție, 81
Bilirubina, 117 -158
Biliverdina, 117
Bioinformatica, 202
Biosinteză, suplimentare energie, 120-121
Biosinteze, 31-32, 107, 131, 143-148, 156, 162, 173
Biotina, 95
Biuret reactie, 11
Bungarsteona, receptor acetilcolina, 188

C
CAAT box, 40, 167
Caderina E, 197
Cadru de citire, deplasare, 49
Caenorilab·ditis elegans genom, 202
Cafeina, 85
Calcitonina, 175
Calciu receptor, hipercolesterolemia familială, 158
Calciu/calmodulin-dependentă, proteinkinaza, 165
Calciu-calmodulin kinaze, 84
Calmodulina, 83-84
cAMP *vezi* AMP ciclic, sinteza, 13-, 109 (Tabel)
Cancer, consiliere, 202
Capacitate tamponare, 10
Captopril, 179
Caracterizare secvență, 84, 88
Carbamilfosfat sintaza, 106-107
Carbomicina, 36 (Fig.)
Carboplatin, 29
Carboxi glutamat, proteine sânge coagulare, 176
Carboxikinaza, 107
Carboxipeptidaza A, 142
Cardiolipina, 172
Carnitinpalmitoiltransferaza, 167-168
Cascade cis-retinal, 174
Caspaze, 202-203
Catabolism 110-114
Catalaza, 76 (Fig.)
Cataliza prin enzime, 76
Catecolamine, 113, 115
Cazeinkinaza 2, 163
Căi anabolice, 120-121
CD4 proteina, 66
CD45, 85
CD8 protein, 66
Cdc2 proteina, în ciclul celular, 22
CDP-DAG, metabolism inositol fosfat, 191
Celule, tipuri de, 2-5
- fasciculate/reticulate, cortex suprarenal, 179
- imortale, 203-204
- plasmatice, 65
- secretoare, 42
- spumoase, 158
- stem, anticorpi, 38 (Fig.), 39, 48
Celuloza, 102
Centrifugare, diferențială, izopicnică, 4
Centrozomi, 3
Ceramide, 171, 173 (Fig.), 174, 191
Cerebrozide, 174
Cetoacizi, 106
Cetogeneză, 134, 137
Cetosfinganina, 174
Cetoză, 100
Chemiosmotic, teorie, 129-130
Chilomicroni,152, 162
Chimotripsina, 77, 142
Chimotripsinogen, 142
Chiralitate, 100
Chiralitate, complex glucidic, 102, 179-182
Chistică, fibroza, 202
Chromatografie de afinitate, 63
Chromatografie *vezi* ecuația Hill, 86
Cianocobalamina, 97
Cianogen, bromura, 14
Ciclic AMP, 85
Ciclic AMP-dependentă, fosforilaz kinaza, 183, 197-199
Ciclic GMP, 85
Ciclobutiltimidina, dimer, 27 (Fig.)
Ciclofosfamida, 29
Cicloheximida, 360
Ciclu, acid citric, 123, 124
- celular, faze D, 22

- Cori, 135-136
- uree, 107-108
- uree, hexokinaza D, 89, 90, 108
Cinetică, 76, 78-81, 89
Ciroza, electroforeza proteine, 62 (Fig.)
Cis retinal, 174
Cistationina, 110
Cisteina, 8 (Fig.)
Cisternae, reticul endoplasmatic, 3
Cistina, 8
Cistroni, 39
Citidin deaminaza, apolipoproteina B-100, 34
- clonală, selecţie, limfocite B, 66
Citidin deaminaza, apolipoproteina E-l 00
Citidin difosfocolina, 172,173 (Fig.)
Citocrom a, 125-128
Citocrom b,127-128
Citocrom c, 91
Citocrom P450 familie, 104
Citocrom, 126
Citocrom, redox potenţial, 125-127
Citocromoxidaza, 126
Citokeratine, 196
Citoplasma, definition 2
Citoschelet, 3, 72-73, 183, 194-196
Citosol conformatie, 2, 5 (Fig.)
Citotoxic, T-limfocite, 66
Citozina, 19
Citrat sintaza, 124
Citrat, enzimă clivare, 146
Citrocrom oxidaza, 126
Citrulina, ciclu uree, 108
Clatrina, 194
- apoproteine pentru, 155
- receptori pentru, 193-194
Clonare, 46
- funcţională, 48
- poziţională, 49
Clorambucil, 29
Cloramfenicol, 36
CMP-PtdOH, inositolfosfat metabolism
CMP-PtdOH, inositolfosfat metabolism, 191
Coagulare celulară, cascadă, 176
Coated pits, receptori, 193-194
Cobalamina, 96, 97
Codoni nonsens, 33
Coduri trei litere, 8 (Fig.), 31 (Tabel)
Coenzima A, 92-97
Coenzima Q *vezi* Ubiquinona, 49
Cofactori, 92
Colagen, 65
Colchicina, 73
Colecalciferol, 174-175
Colesteril esteri, lipoproteine, inhibiţie de contact, 204
Colesterol, 154
- biosinteza, 154
- nivele scăzute, 158
- receptori în macrofage, 158
- reglare, 157
- steroide din, 178
Colipaza, 143
Compactare, 20
Compactina, 158
Complecşi glucide, 179
Complement, 69
Complex sinteză glucide, 181
Complex, 102, 171, 179-182
Complex, lanţ transport electroni, 127-128
Compuşi cu plumb, modificare, 202
Condroitin 6-sulfat, 102 (Fig.)
Conformaţie, schimbări, 78, 87
Congenitală, hiperplazia adrenală, 179
Conjugare, 104
Consens secvenţe, exoni, 37
Constanta de dosociere şi legare, 188
Contaminare factor VIII, 13
Control creştere, 39-42, 204-206
Convulsii, deficienţa de vitamina B_6, 96
Cooperativitate, 86
Coproporfirinogen III, 116 (Fig.), 117
Corpi cetonici, 134, 137-138 (fig)
Corpi cetonici, 134, 137-138 (Fig.)
Corpusculi apoptotici, 202
Cortex suprarenală 179
Corticosteron, 178 (Fig.)
Cortizol, 178 (Fig.), 179
Cosmide, clonare, 49
CPSI, gene, 108
CPT (carnitine palmitoiltransferaza), 167-168
Creatin kinaza, 80, 81 (Tabel), 115
Creatinina, 115
CREB (proteină legare CRE), 166-168, 190
Creier, în subnutriţie, 134 (Fig.)
Criomicroscopie electronică, tehnica „freezeetch", 195
Crioprecipitatare, 13
Cristae, mitochondrii, 3, 125
Cristalografie X, 57
Criză diabetică, 139
Cromatina, 20-22
Cromatografie de înaltă performanţă (HPLC), 14
Cromatografie imunoafinitate, 70
Cromozomi artificiali drojdie, 49
Cromozomi, 21 (Fig.)
Cronomicina, 29
C-terminus, lanţ peptide, 11
Cuplare fosforilare oxidativă, 176
Cuplare transport electroni, 130
Cuplare, fosforilare oxidativă la triptofan, 8 (Fig.), 114-115
Cuplu proteinkinaze/fosfataze, 167
Curbe saturare oxigen, 56-57
Curbe saturare oxigen, hiperbolic, 56
- în criza diabetică, 139
- în sânge, 138
- şi deficienţa de glucozo-6-fosfatază, 139

D

Dacarbazine, 29
Dalton (unit), 13
Decarboxilare oxidativă, 93 (Fig.)
Defect enzimatic, 13, 91-92
deficienţa de glutation, 132
Deficienţa proteine serice, electroforeză, 62
Deficienţa, 108-111, 132, 139, 148
Defosforilare, 82-83
Degenerare, cod genetic, 33
Degradare, 25, 45
Dehidro ascorbat, 132
Dehidroepisitosterona, 178 (Fig.), 179
Dehidrogenaza, 58
Denaturare Sanger, metodă secvenţializare, 26
Denaturări reversibile, 15
Deoxicorticosterol, 178 (Fig.)
Deoxicortizol, 178 (Fig.)
Deoxihemoglobina, 54
Dependenţă, ne-insulinică 138-139
Dermatan sulfat, 102 (Fig.)
Desaturaze, 147-148
Desferoxamina, 64
Detergenţi, DOPAchinone, 113 (Fig.)
- acizi biliari, 156, 157
- membrana plasmatică, 184
Detoxificare, 104
Dextran, gel-permeatie cromatografie, 12-13
Diabet, 138-139
- criză, 139
- hemogobina glicată în, 64
- la tineri (MODY), 138
Diabetes mellitus, secreţie, 138-139
Diacilglicerol, 191
Diagnostic antenatal, ADN recombinant, 47
Dializa, enzime, 92
Diareea, şi intoleranţa la lactoză, 143
Dibromo-γ -linolenic acid, prostaglandine din, lizozim albuş, 59
Dicloroacetat, acidoza lactica, 167
Dideoxi nucleotide, metoda Sanger, 26
Dieta, proteine în, 108
Dietilstilbestrol, 42
Difuzie facilitată, 196-197
Digestie, 142, 143
Diglucide, 101-102
Dihidrobiopterin reductaza, 111, 114
Dihidrofolat reductaza, 111, 114
Dihidrofolat reductaza, 26
Dihidroxi acetonfosfat, 122
Dihidroxi colecalciferol (1,25-) 174-175
Dihidroxi(1,25-) colecalciferol (174-175)
Diizopropilfluorofosfat, 77, 88
Dinamică instabilitate, microtubuli, 73
Dinamică mutaţie, 49
Dinitrofenol (2,4-), 130
Dinitrofenol(2,4-), 130
Dioxid de Carbon, efect hemoglobină, 57, 62 (Fig.)
Dipalmitoilfosfatidilcolina, 160
Diploidie, 2
Disfosfoglicerat, 56, 57
Distamicin, 29
Distribuţie în ficat, 165-166
Distrofină, gena, 49
Disulfiram, 91
Docosahexanoic acid, 147 (Fig.)
Dogma centrală (Crick, F.), 18, 29
Dolichil difosfo-oligoglucide, 181
Dolichil fosfat, 180, 181 (Fig.)
Domenii în proteine, structura terţiară, 58
Domenii proteice, 58
Dopamina, gene reglare, 166-167
- catecolamine din, 113
- din L-DOPA, 113
Drosofila, sevenless mutant, 206 (note)
Drosophila, sevenless mutant, 206(note)Dabsil clorura, reacţie N-terminus, 14
Duchenne, distrofie musculară, 49
dUMP, metabolism, 26
Dyneina, 73

E

E_2 (enzima de transfer ubiquitina), 45
Echilibru, 106
Ectopic, protein sinteza, 30
Editare ARNm, 34
Edman degradare, 14
EDTA, sânge specimene, 62
Efect heterotropic allosteric, 85, 184

SUA SIVICENTA UNIVERSITY LIBRARY

Efect homotropic allosteric, 85
Efecte antibiotice, 28, 29
Eicosanoide, 176-178
Eicosatrienoic acid, 148
Elastaza, 77
Elasticitate (coeficient), control metabolic, 88
Elasticitate(coeficient), metabolic control, 88
Electroforeza, 62 (Fig.)
Electroforeză agaroza, proteine, 12
ElFs (factori initiere), 35
Elongare enzime, 148
Embrionic, celule stem, şoarece „knock-out", 48
Emfizem, 63
Encefalina, 11, 32
Endoamilaze, 142
Endocitoză, 2
Endonucleaze, 27
Endoperoxizi, 177
Endoplasmatic reticul, 3, 5 (Fig.), 42
Endorfine (β-), 32
Endozomi (sistem), 193-194
Energie liberă Gibbs, 81, 120-121
Energie, sarcina, 9, 93 - rezerve, 142
Enolaza, 122-123
Enzima marker, 5 j
Enzime, 76, 79-97
- imunoteste (ELISA), 69-70
- inducţie, 104
- în celule în perie, 143
- teste, 79-81
Enzime, 76-97
- inhibiţie, 88
- alosterice, 85-87
- situsuri active, 76
- conformaţie, 78, 87
- distribuţie în ficat, 165-166
- diversitate genetică, 88-92
- cinetică, 76, 78-81, 89
- marker, 5
- secvenţializare proteică, 14
Epimeri
- reglare, 82
Epimeri, 100
Epitopi, 68
Epoxizi şi vitamina K, 176
ErbB oncogena, 205, (Tabel)
Eritrocite, 194
Eritromicina, 36 (Fig.)
Eritrozo 4-fosfat, 145
Estradiol, 42 (Fig.), 178 (Fig.)
Estrogen, receptor, 41-42, 177
Estrogeni, 179
Estrona, 178 (Fig.)
Eucariote, 2 - ca vectori ADN, 46 - ribozomi în, 34
Eukaria, eucariote, 2
Evoluţie, convergentă, 91
Excizie, introni, 37-38
Exoamilaze, 142
Exocitoză, 2, 45
Exoni, 37-38

F

Factor de creştere, epidermal, receptor, 192, 204
Factor intrinsec, 97
Factor necroză tumorală (TNF), receptor, 191-192
Factori cis, 40
Factori creştere, proteina legare de receptor, 286
FAD *vezi* Flavin Adenin Dinucleotid
FAD *vezi* Flavin Adenin Dinucleotid, 94-95
Fag α, 46
Fagocitoză, 2, 45
Faraday, constanta, 126
Farnesil difosfat, 155 (Fig.)
Faza acută, răspuns, 100
Faza S, ciclu celular, 22
Fehling, soluţie, 101
Fenilalanin hidroxilaza, 111-112
Fenilalanina, 8 (Fig.)
Fenilcetonuria, 111
Fenilizotiocianat, degradare Edman, 14
Fenilmetilsulfonilfluorură, 77
Fenobarbital, efect AMP-dependent, 45
Feritina, 64, 65
Ferochelataza, 117 G
Fibre „Fast Witching", 70
Fibrina, 195 (Fig.)
Fibrina, situs legare fibronectina, 198 (Fig.)
Fibrinogen, 52
Fibronectin, 198-199
Fibroza chistică, 202
- clonare poziţională, 49
- produs genic, 59
Ficat, metabolism reglare, 162
Ficat, mitochondrii, 131 (Fig.), 132
Ficat, preluare şi secreţie triacilglicerol, 148-149, 153
- alcool dehidrogenaza citosolică, 90
- boală, 81
- corpi cetonici, 138
- inaniţie, 134
- metabolism glicerol, 163-164
- metabolism lipidic, 162
- morfologie, 165-166
- teste funcţionale, 62
Ficat, secreţie, 148-149
Fier metabolism, 64
Filamente intermediare, 3, 73, 194-196
Filamente, muşchi striaţi, 71, 72
Filamina, 195 (Fig.)
Fischer, proiecţie glucide, 100
Flavin adenin mononucleotide, 92, 94-95, 125, 195
Flavoproteine -ι -legături peptidice, în glutation, 131, 145
Fluorescenţă microscopie, immunocitochimie, gangliozide, 70, 173-174, 180, 181
Flux, coeficient de control, 88
Flux, metabolism, 87
FMN *vezi* Flavin mononucleotide, 195 (Fig.)
Folat, deficienţa, 110
Formare HDL, 153
Formare strat dublu lipidic, fosfolipide, 18
Formilmetionina, lanţ iniţiere, 35
Formiminotetrahidrofolat, 95-96,114
Formiminotransferaza, deficienţa, 114
FOS, 166, 167
Fosfat anhidride, în glicoliză, 122
Fosfataza acidă, 81 (Tabel)
Fosfataza alcalină, 81 (Tabel)
Fosfataze, 81
Fosfatidilcoline, *vezi* metabolism lecitină, 106-117
Fosfatidiletanolamina, 172 (Fig.) 1
Fosfatidilglicerol, 172
Fosfatidilinositol, 172 (Fig.), 173
Fosfatidilserina, 172 (Fig.)
Fosfocreatina, 115
Fosfodiesteraze, 85, 173
Fosfoenolpiruvat carboxikinaza, 68, 136, 164, 165
Fosfofructo-2-kinaza, (6-) 164
Fosfofructokinaze, 86,122
Fosfofructo-l-kinaza (6-), reglare, 166 (Fig.)
Fosfoglucomutaza, 135
Fosfogluconat (6-) dehidrogenaza, 145
Fosfoinositol 3'-kinaza, 187
Fosfoinositoli, 85, 173
Fosfoinositol-specifică, fosfolipaza C, 173, 191
Fosfolipaza A2, activitate prin necroză, factor receptor, 191-192
Fosfolipaza C, 173, 191
Fosfolipaze, 172-173
Fosfolipide,
- acizi graşi nesaturaţi, 160
- în digestie, 143
- în membrane plasmatice, 184
Fosfolipide, 172-174
- grupări-cap, 172,184
Fosforiaza, activare, 1, 135
Fosforibozilpirofosfat, 107
Fosforiboziltransferaza, 68
Fosforilare, 82-83, 122, 128-130
Fosforilatkinaza dependentă de AMP ciclic, 162, 163, 189, 205
Fosforilaz kinaze, 163
Fotosinteza, 120
Fracţionare genom, 49, 202
Fragmentare ADN, replicare, 23
Fructoza, 100 (Fig.)
Fructozo 2,6-difosfataza, reglare 137, 166
Fructozo 6'fosfataze, 166 (Fig.)
Fructozo bisfosfataza, 137
Fructozo fosfataze, 166 (Fig.)
Fructozo-2,6-disfosfat, 164
Fructozo-6-fosfat, 145, 164
Fucoza, 179 (Fig.)
Fungi, 36
Furanoza, 100
Furina, 31

G

GABA (acid γ -aminobutiric), 115
Galactocerebrozid, 173 (Fig.)
Galactokinaza, deficienţă, 10
Galactoza, 100 (Fig.)
Galactozemia, 103
Galactozilceramide, 174
Galactoziltransferaza, ca enzimă marker, 5
Gangliozide, 173-174, 180-181
GAP (proteina de activare GTPaza), 193, 205
Gel permeaţie, electroforeză, 11-13, 22-24
Gel-permeatie, cromatografie, 12-13
Gelsolin, 195 (Fig.)
Gena, hexokinază, 90
Gene ancestrale, 59
- coordonare, 40, 111-112
- tumorale supresoare, 203
- în transaminare, 106
- probe, 47-48
- produs, 39, 59
- şoc termic, 49
Genetica inversă, 48-49
Genetică, diversitate enzimatică, 88-92
Genetică, inginerie, 45-49
Genom conjugare, 104
Genom uman, 49, 202
Genom, „splicing" alternativ, 38
Genom, GC box, 40

George III (rege), 117
Geranil difosfat, 155 (Fig.)
Geranilgeranil difosfat, 185, 122
Glicani, 102
Gliceraldehid 3-fosfat, 122, 145
Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza, 91, 122
Glicerol 3-fosfat dehidrogenaza, 130, 144, 166
Glicerol 3-fosfat, 172
Glicerol 3-fosfat, naveta, 130
Glicerol, gluconeogeneză, 136
Glicina, 8 (Fig.)
Glicoforina, 184
Glicoforina, 184
- polidispers, 145
Glicogen fosforilaze, 135, 162-163
Glicogen fosforilazkinaze, 135
Glicogen metabolism, 16, 164
Glicogen sintetaz kinaze, 163
Glicogen sintetaza, 144-145, 162-163
Glicogen, 102, 134-136
Glicogen, boală stocare, 139-140 (Tabel)
Glicogen, enzima deramificare, 135, 163
Glicogen, structura, 134
- în particule, 163
- şi reglarea metabolismului, 162-167
Glicogeneza, din glucoză, 143, 144-145
Glicogenina, 134, 144-145
Glicogenoliza, 134-135
Glicolipide, 180-181 *vezi* Hemoglobina „Sickle-cell"
Glicoliza, 82, 120 (Fig.), 122-123
Glicoproteine, 36, 102-103, 180-181
Glicosaminoglicans, 103
Glicosilfosfatidilinositol, grupări (GPI), 185
Glicozidaze, 101
Glicozide, 101
Globule roşii, *vezi* eritrocite
Globuline, 62
Glomeruli, celule cortex suprarenale, 179
Glucani, 102
Glucanotransferaza, 135
Glucide, chondroitin 6-sulfat, 102 (Fig.)
Glucide, legate de N- 180
Glucide, legate de O- 180
Glucide, sinteza, 181
Glucocorticoide, 179
Glucokinaza *vezi* Hexokinaza D carnitin esteri, 167-168 (Fig.)
Gluconeogeneză, 8, 136-137
Gluconic acid, 103
Glucoza, 143-144, 145-147
- chiralitate, 100
- nivel de control în sânge, 138-140
- pui, 160
- toleranţa, 138
Glucoza,niveluri de control în sânge, 138-140
- efect asupra a-cetoacid dehidrogenaze, 94
Glucozidaza (1,6-), 135
Glucozil ceramide, 174
Glucozo 1-fosfat, 135
Glucozo-6-fosfat dehidrogenaza, 145
Glucozo-6-fosfat isomeraza, 122
Glucozo-6-fosfataza, 135, 137, 164
- deficienţa, 139
Glucuronide, 104 (Fig.)
Glutamat decarboxilaza, 115
Glutamat dehidrogenaza, 106
Glutamat dehidrogenaza, 106
- distribuţie hepatică, 165, 166
Glutamin sintetaza, 107
Glutamin sintetaza, distribuţie hepatică, 165, 166
Glutamina, 8 (Fig.) 1
Glutaminaza, 107
Glutation, lanţ polimerazic, cod genetic, 33
Gluten de grâu, 108
GMP ciclic, 85
Gonadotropina umană, 16
Gradient în ficat, 166
Grăsimi animale, 160
Grb2 (receptor tirozinkinaza), 204, 205
Grb2, reglare 166 (Fig.)
Grunstein-Hogness, colonii test, 49
Grupări „cap" în fosfolipide, 172
Grupări funcţionale, prioritate, 9
GSK-3, 163
GSSG (glutation oxidat), 131
GTP, 19
Guanidina, 115
Guanilil ciclaza, 85
Guanine, 19
Guanozin difosfofucoza, 103
Guanozin difosfomanoza, 103
Gulonolactonoxidaza, 97

H
Haploidie, 2
Haptoglobina, punct izoelectric, 11 (Tabel)
HAT, mediu de cultură, 68
Helicaze, replicare ADN, 23, 24
Helix-buclă-helix, proteine, 40-41
Hem *vezi* Histone hem, 21-22
Hem, 115-117
Hemiacetali, 100, 101
Hemidesmozomi, 199
Hemoglobina S *vezi* Hemoglobina „sickle-cell", 20, 33, 55
Hemoglobina, 29 54-56 (Fig.), 64
- curbe saturaţie, 56
- fetală, 57
- glicată, 64
- polimorfism, 54-55 - legare, 55-56
- punct izoelectric, 11 (Tabel)
Hemoglobina, 54-56 (Fig.), 64
- curbe de saturare cu oxigen, 56-57
- genetică, 40
- sinteza, 31
Hemoglobină, 55
Hemosideroza, 64
Henderson-Hasselbalch, ecuaţie, 80
Heparina, 102 (Fig.)
Hepatita virală, transaminaze, 80
Hepatocite, distribuţie enzime, 165-166
Heteroduplex, 49
Heterofilic, legare, molecule de adeziune,
Hidroperoxizi, 175, 197-198
Heteropolimer, 90
Heteropolimeri, 90
Hexametilmelamina, 29
Hexokinaza D hepatică, 90, 164
Hexokinaza D, 89-90, 164, 184
Hexokinaze, 89-90
Hexoze, 100
HGPRT, 25-Hidroxi colecalciferol, 174
Hibridizare *in vitro*, 47
Hibridoma formare, 68-69
Hidrofilicitate, 156, 157 (Fig.)
Hidrofobe, domenii în membrane, 12
Hidrofobe, grupări „coadă" în fosfolipide, 184
Hidrofobe, în acizi biliari, 156, 157 (Fig.)
Hidrofobe, legături în proteine, 12
Hidrofobe, resturi în proteine globulare, 52
Hidroperoxizi, 175
Hidroxi corticosterol, 178
Hidroxi progesteron (17 α-), 178
Hidroxi tamoxifen, 42
Hidroxi triptamina (5-) *vezi* Serotonina
Hidroxi triptofan (5-), 55, 111
Hidroxibutirat dehidrogenaza, 137
Hidroximetilglutaril CoA, 137
Hidroxipregnenolona, 178 (Fig.)
Hidrura, ion, 125
Hill, ecuaţie, 86
Hinge, regiune imunoglobuline, 67
Hipercolesterolemia, familială 158, 159
Hiperglicemia, 138
Hiperinsulinemia, 140
Hiperlipidemia, 157-159
Hiperplazia, 179
Hipertensiune, 179
Hipertermofile, 2, *vezi* infarct miocardic
Hipoglicemia, 13
Hipoxantina, 19 (Tabel)
Hipoxantin-guanina, 68
Histamina, 113-114
Histidina, 8 (Fig.)
Histone, 21-22
HIV, *Human Imunodeficienncy virus*, 29
HLA, Antigene, 66
HMG CoA *vezi* Hidroxi metilglutaril CoA
HMG-CoA reductaza, 154, 157
HMG-CoA reductaza, 154, 157
- inhibare, 185
- reglare, 169
- şi elemente reglatoare steroli, 168-169
Hn-RNA (pre-ARNm), 37
Holera, toxina, ADP-ribozilare, 189, 190
Homeostazie termică, 88
Homocisteina, 109-110
Homofilică legare, molecule de adeziune, 197
Homogentizat dioxigenaza, 110, 166
Homoserina, 110
Hormon de creştere, 16
Hormon paratiroidian, 175, 193
Hormon, adrenocorticotrop, 179
Hormon, eliberare tirotropina, 16
Hormoni
- mecanisme, 41
- steroidici, 178-179
Hormoni pituitari, sinteza, 32
Hormoni, 16
Huntington, boala, 48

I
ICAM, 198 (Fig.)
IgA, 67
IgG, 66, 67
IgM, 67
IgM, lanţ greu, 3
IgM, monomer, 38
Imbătrânire, 204
Imidazolil acetat, 113
Imun, sistem, 65-70
- răspuns, 66
Imunitate celular mediată, 65, 66
Imunitate umorală, 65-66
Imunocitochimie, 70

Imunodeficienţa, primară, 153
Imunoglobuline, 38, 65-70, 127
- legare proteine, 44, 68
Imunologică, memorie, 66
Imunotest, 69-70
Inductori, control sinteză proteine, 39
Inducţie enzimatică, 81
Infarct miocardic, 70
Infecţii, electroforeza proteine serice, 62
Influenza, virus, inhibare neuraminidaza, 202
Inhibare competitivă, enzime, 79
Inhibare, 130, 185
Inhibitor bacterian, 2 Cl, 59
Inhibiţie necompetitivă, enzime, 79
- de contact, 204
- enzimatică, 79
- prin „feedback", control metabolic, 88
Iniţiator ARNt, 35
Iniţiere, codon 33
- factori, 35
Innădire „splicing", 38-39
Inozina, ARN transfer, 18
Inozitol fosfaţi, 191
Inozitol *vezi* Fosfoinozitoli, unităţi Katal, 80
Inozitol,4,5-trizfosfat Ins(1,4,5)P3, 173, 191
Inserţii, secvenţe ADN, 26
Insulina, 11, 162-163
- receptor, 186-187
Insulin-dependent, *diabeti mellitus*, 138
Insulinoma, 140
Integrine, 198, 199
Intercelular, molecule adeziune, 198
Interfaza, ciclu celular, 22
Interleukina-6, complement, 69
Intestine
- colesterol, 157
- preluare celulară triacil gliceroli, 153
Introni, ADN, 37-38
Inversie, ADN, 49
Iodo tironine, 112
Ionizare proteine, 11, 12
Islet celule, şi hexokinaza D, 90
Islet, proteina activatoare, ribozilare G, 189
Isoenzime, 88-91
Isoenzime, 88-91
- măsurare, 91
Isopentenil fosfat, 154
Isozime *vezi* Isoenzime Lipaze, 143
Izoleucina, 8 (Fig.)
Izomeri, albumina serică, 63
Izoprenil grupări, ancorare membrane, 185

J
Jun, proteine, 166, 167

K
Keratan sulfat, 102 (Fig.)
Keratine, 196
Keratinocite, vindecare răni, 199
Kilodalton (unităţi), 13
Kinaza, 165
Kinezina, 73
Klenow, polimeraza, 49
Knock-out, şoarece, 48
Krebs, H. *vezi* ciclu acid citric

L
Lactat dehidrogenaza, 81 (Tabel), 90, 123
Lactat, 123
Lactatdehidrogenaza, 90
Lactaţie, 181
Lactaza, 143
Lactogen, 16
Lactoz sintetaza, 181
Lactoza, 101-102, 181
Lactoza, intoleranţa, 143
Lamina, nucleu, 3
Laminine, 196
Lanţ antiparalel ADN, 18 (Fig.)
- elongare, rol ARNt, 34-35
- iniţiere, ribozomi, 35
- terminare, 35
Lariats, splicing ARNm, 37-38
Lat operon, 39
L-DOPA,113
Lecitin-colesterol aciltransferaza, 153
Lecitine (fosfatidilcoline), 172 (Fig.)
Legare proteine, 64—65, 153
- analiză, 188
- enzime, 145
- pocket, 78
- situs fibronectină, 198 (Fig.)
Legături axiale în glucide, 101 - covalente în proteine, 12, 52 - duble, acizi graşi, 147 - necovalente, proteine, 12
Legături de hidrogen
- în ADN, 70
- în proteine, 12, 52
- în proteine, 12, 52
- încărcare electrică, 77
Legături ecuatoriale, în glucide, 101
Leucemie cronică, limfocite, 135-136
Leucemie, cronică limfocitară, 40
Leucina, 8 (Fig.)
- aminopeptidaza, 142
- zipper, 40, 41
Leukotriene, 177-178
Lewis, grupă compuşi sânge, 180
LFA-l, funcţie asociată cu limfocitele, 81
L-Gulonolacton oxidaza, 97
Liganzi, 188
- în albumina serică, 63
Limfocite B, Imunoglobuline, 38, 65, 66
Limfocite Killer T, 66
Limfocite, citotoxicitate, 66
- şi HIV, 29
Limfocite, Helper T, 66
Limită, dextrine, 143
Limită, dextrinoză, 140 (Tabel) (Fig.)
Lineweaver-Burk plot, 79
Linkeri, DNA, 49
Linoleic acid, dietă, 159
Linolenic acid, 147, 148
Lipaza hepatică, 153
Lipaze, 143
Lipide, 100 (Fig.)
Lipide, metabolism, 162
Lipogeneza, 146, 168
Lipoliză, 134
Lipoprotein lipaza, 152
Lipoproteine
- densitate intermediară, 152-153
- densitate înaltă (HDL), 149
- densitate înaltă, formare, 153
- metabolism reglare, 152, 169
- plasmă, 152, 159
- receptori, 154-156
Lipoproteine (LDL), 152, 156, 186 (fig), 202
Lipoproteine, 148-149, 152-156
Liposolubile, vitamine, 174-176
Lipotropina (β-), 32
Lipoxigenaze, 177
Lizina, 8 (Fig.)
- ionizare, 11
- lizozomi, 59
- punct izoelectric, 11(tabel)
- structura terţiară, 58-59
Lizozim, structura terţiară, 58, 59
Lovostatin (mevinolin), 158
Lupus eritematos sistemic, anticorpi antinucleari, 38

M
Macrofage, grupări, Lewis, 180
- nivel de control, 138-140
- receptori în, 158
- rol în elongarea lanţului ARNt, 35
- rol în lanţ transportor de electroni, 127
- rol în oxidarea aizilor graşi, 122
- specificitate grup A, mucine, 180
Markeri enzimatici, 5
Masa moleculară, 13
Maturare enzima *Diabeti mellitus*, 138-139
McArdle's boala, 140 (Tabel)
Medicamante, reglare prin kinaze, 82
Medicamente, modificare, 158
Melanina, 113
Membrana nucleară, 2
Membrană plasmatică, 5, 184-186, 196-197
Membrane, ataşare, 185
Membrane, proteine, 184
- ribozomi, 42
- transport, 196-197
Meromiozina, 72
Metabolice, funcţii, 5
Metabolism,
- control, 87-88
Metabolism, 25, 103, 104, 106-107, 121, 123
- calciu, os, 175
- glicogen, 163
- inositolfosfat, 191
- nucleotide, reglare 82, 166-167, 168-169,166
- nucleotidic, 25 (Fig.), 26
- reglare, 81-84, 161-170
- subnutriţie, „fasting", 134-137
Metalotioneina, 49
Methemoglobina, 55-56
Metilen tetrahidrofolat, 26, 95-96
Metionina, 8 (Fig.)
- în iniţiere lanţ, 35
Micele
- efectul lipazelor, 143
- formare bilă, 156-157 (Fig.)
- membrana plasmatică, 184
Michaelis
- constanta, 78-79
- ecuaţia, 78-81
Microtubuli, 3, 73, 196
Microvili, 195
Microzomi, fracţie, 4-5 (Fig.)
Mieleron(bisulfan), 29
Mielom multiplu, proteine electroforeză, 62 (Fig.)
Mineralcorticoizi, 179
Minisateliţi, *vezi* regiuni hipervariabile
Miofibrile, 70-71
Mioglobina, 54
Mioglobină, 52, 53-54
Miokinaza (adenilatkinaza), 93
Miotonic, distrofie, 48 (Tabel)
Miozina, 52, 71-72
- citoschelet, 195 (Fig.)

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Mitocondrie, membrana internă, 3, 44, 125,129, 130
Mitocondrii,
- cod genetic, 33
- oxidare acizi graşi, 121-122
- pompa protoni, 127
- transport electroni, 124-125
Mitocondrii, 3, 44, 125
Mitocondrii, 3, 5(Fig.), 130-132
Mitocondrii, metabolism, 131 (Fig.), 132
Mitocondrii, proteine, 44-45
Mitomicina C, 29
Mitoribozomi, 44
Mitoza, 22
- microtubuli în, 73
Moarte celulară, 202-204
Molecula de adeziune epithelială Ca^{2+} -dependentă, receptor insulinic, 187
Molecula de adeziune neurală (N-CAM), 198 (Fig.)
Moleculară, sciziune, 52
Moleculare, formare de variante, 36
Molecule de adeziune, 183, 197-199
Monoacilglicerol, 143
Monoaminoxidaza, 106-107 (Fig.), 113
Monoclonali, anticorpi, 68-69
Monoglucide
- interconversii, 103
Monoglucide, 100-101
Monoxigenaze, 104, 111
Morfologia hepatică, 165
Morfologie, 165-166
Motor celular, 70-73
Mucine, 180
Mucolipidoze, 43
Multienzime, 30
Muşchi netezi, 70, 72
Muşchi striaţi, 70, 72, 115
Muşchi, 70-72, 162-163
Muşchi, oxidare anaerobă, 123
- în criza diabetică, 139
- lactat dehidrogenaza, 90
- metabolism glicogen, 162-163
- utilizare corpi cetonici, 138 (Fig.)
Mutageneza in vitro, 26
Mutante Null, 48
Mutaţii punctiforme, 36
- defecte enzimatice, 91
- *in vitro* mutageneza, 26
- receptor insulină, 187
- a-antitripsina, 63
Mutaţii punctiforme, 36 Polimorfism, 54-55
Mutaţii, deplasare cadru, „frame shift", 49

N
N-Acetil galactozamina, 101
N-Acetil galactoziltransferaza, 107
N-Acetil glucosaminiltransferaza, în aparat Golgi, 43, 181
N-Acetil glucosarninidaza, 81
N-Acetil glucozamine, 180-181
N-Acetil glutamat, 107
N-acetilglucozaminidaza, 81
NAD, 92-93
- biosinteza, 115
- dehidrogenaze, 58
- redox potenţial, 126
NADH, transport electroni, 125-126, 128
- dehidrogenaza, 125
- lipogeneză, 146
- oxidare acizi graşi, 122
- oxidare, 82
- producţie lactat, 123
$NADP^+$, 92, 93, 121
NADPH, reducere glutation
Necroză, 202, 131-132
Neurotransmiţători, 115
Niacina, deficienţă, 93
Nick, procedură de tranlaţie, 49
Nicotinamid nucleotid, situsuri de legare, 91, 92 (Fig.)
Nicotinamid nucleotide, 92, 93
Nicotinamida, deficienţă, 93-115
Nicotinic, receptori acetilcoline, 187-188
Ninhidrina, 10
Nitric, oxid, 192 (Fig.), 192
Nitrogen mustard, 29
Nomenclatura raport P/S, acizi graşi plasma, 159-160
Non-codificatoare regiuni, ARNm, 34
Non-sens, codoni, 33
Noradrenalina, 113
Norethindrona, 42 (Fig.)
Northern blot, 47
Nucleară, localizare secvenţe, 44
Nucleare, membrane, 2
Nucleare, proteine, 44
Nucleari, pori, 2, 3 (Fig.), 44
Nucleol, 2
Nucleotid coenzime, 93-94
Nucleotide, 18
Nucleotide, metabolism, 25
Nucleotide, reparare excizie, 27
Nucleotide, sinteza, 25 185
Nucleotide-glucide, intermediari, 103
Nucleozide, 18
Nucleozomi, 21-22
Nucleu, 2-3, 5 (Fig.)

O
Ocitocina, 16
Okazaki, fragmente, 23
Oligodeoxinucleotide, 30
Oligoglucide, 102
Oligomicina, inhibare ATP sintetaza, 130
Oligozaharidaze, 143
Omogenizator (Potter), 4
Oncogene, 28, 204-205
Oncogenic, virusuri 28, 204, 205 (Fig.)
Oncornavirusuri *vezi* Retrovirusuri zone periportale, 165
One-carbon metabolism, 96, 110
Operoni, 39
Opsina, 174
Organite, 2
Organofosfaţi, 7
Ornitin carbamoiltransferaza, deficienţa, 108 (Tabel)
Ornitina, ciclu uree, 108
Ovalbumina, punct isoelectric, 11 (Tabel)
Oxaloacetat,
Oxaloacetat, 109-110, 123, 124, 146
Oxidare (β-) acizi graşi, 121-122
Oxidare anaerobă, 123
Oxidare hiperbarică,
- legare hemoglobina, 55-56
- toxicitate, 131-132
Oxidare, 120 (Fig.), 121-123
Oxidare, 120 (Fig.), 121-123, 124-128
Oxidativ, decarboxilare, 93 (Fig.)
Oxigen hiperbaric, 131
Oxigen protein kinaza /fosfataza, cuplu, 167
Oxihemoglobina, 54
Oxitocina, 16
Oxoglutarat, 106

P
p53 (gene tumale supresoare), 203
Paget, boala, 175
Palindromi, 49 165
Palmitoil CoA, din sfingamină, 174
Pancreas reglar, 166 (Fig.)
Panteteina grupare, transportor acil, 147
Paraproteine, 62 (Fig.)
Parkinson, boala, 113
Parvalbumina, *vezi* calmodulina, 83
Patogenicitate, transfer, pneumococci, 22
PCR *vezi* Lanţ reacţie polimerază, 27, 47-48
PDGF, Platelet-derived growth factor, semnalizare, 204, 205, 192-194
Pelagra, 93 (Fig.)
Penicilina, 36
Pentamer IgM, 38
Pentoze, 100
Pentozo fosfat, cale metabolică, 145-146
PEP carboxikinaza *vezi* Fosfoenolpiruvat protein kinaza C, 83
Pepsina, 142
Pepsinogen, 142
Peptida C, insulina, 32
Peptide isomeraza disulfurică, 44
PEP carboxikinaza *vezi* Fosfoenolpiruvat carboxikinaza
Poliomelita, virus, 28
Poly(A), capăt ARNm, 34
Policistromic ARNm, 39
Policlonal, anticorpi, 68
PCR, reacţia în lanţ a polimerazei, 27, 47-78
Polinucleotide, polaritate, 18
Poliribozomi, în sinteza proteică, 39
Poliglucide, 102-103
Polinesaturaţi, *vezi* acizi graşi
Porfobilinogen, 115-117
Pofiria, 116 (Tabel), 117
Post-translaţional, modificare proteine, 18
Potter, omogenizator, 4
PP-1G(proteina fosfataza-1), 163
Pre-ARNm, 37
Precipitina, reacţie, 68
Pregnelona, 178
Prenilderivaţi, 155 (Fig.)
Prenil, grupări, ancorare membrane, 185
Preproinsulina, 32
Preproteine, 32, 42
Primozomi, 24
Pro-hormoni, 16
Procaspaze, 202, 203
Prochiralitate, 9
Procolipaza, 143
Procolagen, 43
Proencefalina, 32
Profiline, 195 (Fig.)
Progesteron, 42 (Fig.), 178
P/o raport, proces chemisnetic, 129
P/S, raport, acizi graşi, 159-160
PAGE (gel electroforeză poliacrilamidă),
Proteine, 11-12
Peptide, 11, 16
Peptide, legături, 10, 52-53

BIBLIOTECA FACULTĂŢII DE MEDICINĂ UNIVERSITARĂ

Peptidil transferaza ficat, 163-164
Peroxid de hidrogen
- inactivare, 131
- eliminare, 3
Peroxisomi (microcorpusculi), 3, 5 (Fig.), 44
Peroxizi, 175
PEST domeniu, 85
Pigmenți biliari, 117
Pinocitoză, 2
Piridoxal fosfat în, 92, 96
Pirimidine, dimeri, 27
- *n* acizi nucleici, 19
Piroaze, 100
Piruvat
- glucozo 6-fosfatază, deficiență, 139
- în lipogeneză, 146
- în sinteza aminoacizi, 109-110
- metabolism, 121-123
Piruvat carboxilaza, 95, 123, 136, 164, 165
- dehidrogenaza, 123
Piruvat kinaza, 122, 164-165
Piruvat kinaza, 122, 164-465
- reglare, 166 (Fig.)
Piruvat, 167
Pits *vezi Coated pits*, membrana externă, mitochondrii, 125
Plasmide, 45-46
Platina, medicamante anticancer, 29
Plăci ateroscleroză, 158
Pneumococci, transfer, 22
pO_2, curba de saturare hemoglobină, 56
Polipeptide, 11, 14-15
Polymerase Chain Reaction, 48
Pompă, transport electroni, 127
Porfiria acută intermitentă, 116 (Tabel), 117
Potențiale de acțiune, 197
Potențiale de acțiune, 197
- Pka, 9-10, 80
- PKA, *vezi* Proteinkinaza AMP-dependentă
Pozițional, 49 162, 163, 189, 205
Preluare celulară, triacilglicerol, 153
Preluare, 153
Primaza, în biosinteza ADN, 23, 24, 204
Prioni, 16, 31
- șoarece „knock-out", 48
Procariote
- ribozomi la, 34-35
- sinteze proteice în, 40
Progestina, antagoniști, 42
Proinsulina, 31-32
Prolactina, 16
Prolina, 8- în legături peptidice, 10
- scindare, 97
- sinteza, 109 (Tabel), 110
Promotori, ARN polimeraza II, 39-40
Proopiocorticotropina, 16
Propeptide, 31
Propilamina, 110
Proproteine, 31
Prostaglandine, 177
Prosteon-specific, antigen, 81
Proteaza, inhibare, 202
Proteaze, în sinteza proteică, 31-32
Proteikinaza B, 205
Protein disulfit izomeraza, 16
Protein kinaza A, 83, 163, 189, 205
Protein kinaza C, 83, 187
Protein kinaza C, 83,191
Protein serin/treonin kinaze, 82-83
Protein tirozin kinaze, 84
- în semnalizare celulară, 192-193
- receptor insulină, 187
Proteina A (N-Acetilglucosamine galactosi transferaza), 180-181
Proteina B (α-lactalbumina), 59, 181
Proteina C, 59
Proteina Calciu/calmodulin-dependentă, 2
Proteina C-reactivă, 81
Proteinaza „quencing", 14
Proteine G, heterotrimerice, 189-190
Proteine serice, 11, 62-63
Proteine, 16
- sinteză, 32
Proteine, 8-16, 31, 57-59, 189
- „housekeeping", 42
- ARN plasmatic heterogen (pre-mRNA), 37
- conformație, 53
- degradare, 45, 106
- din animale transgenice, 48
- electroforeză, 62 (Fig.)
- familii, 58, 59 - fibrilare, 52
- fier-sulf, lanț transport electroni
- fuziune, 49
- globulare, 52-53, 62
- integrale, membrane proteine, 184
- intrinseci, membrane, 184
- membrană celulară, 185-186
- omologe, 59
- periferice de membrană, 184, 185
- plasmă, 62-63
- ser, 11, 62-63
- sinteză, 39-40
- vegetale, dietă, 108
- α−helix, 52 (Fig.), 53
Proteine, 8-16, 51-59
Proteine, cinetică, 42-45
- acilare cu acizi grași, 185
- autoasamblare, 16
- degradare, 45
- dieta, 108
- digestie, 142
- în replicare ADN, 23-24
- hormoni, 16
- din mitocondrii, 44-45
- inginerie, 26
- împachetare, 57-59
- lanț glucidic în, 180
- purificare, 12-13
- sinteză, 30
  - aminoacizi implicați, 31
  - factori cis/trans, 40
  - control global, 39
  - specializare, 30
  - control specific, 39
  - vegetale în dietă, 108
- specializate, 62-73
- variante moleculare, 36
- în membrane plasmatice, 183-184-186
Proteinfosfataze, 84, 163
Proteinfosfataze, 84, 163
Proteinkinaza A, *vezi* PKA
Proteinkinze, 82-83
- AMPc- dependența, 135, 163, 189, 205
- PDGF sistem semnalizare, 205
- TWF-receptor, cascadă, 191-192
Proteoglicani, 102-103
Proteozom, 169
Protoni, donori, aminoacizi, 9-10
Protooncogene, 28
Protoporfiria, eritropoietică, 116 (Fig), 117
Protoporfirina, IX 116 (Fig.), 117
Protoporfirinogen, IX, 116, 117
Protrombina, 176
PtdIns (1, 3, 4, 5) P_4, 191
Pteroic, acid, 95
PTP, *vezi* protein fosfataze
Punct izoelectric, proteine, 11
Punct izoelectric, γ1-globulina, 11 (Tabel)
Punct izoionic, 11
Purine, acizi nucleici, 19
Puromicina, 36

Q
Q, ciclu, 128

R
R, centru chirol, 9
R, configurație carbon, 100
R, suşă pneumococi, patogenitate, 22
Radicali liberi, 131, 175
Radioimunoanaliză, 69
Raf(MAP kinaz, kinaz kinaza), 205
Raport P/O, proces chemiosmotic, 129
Ras, oncogena, 205 (Tabel)
Ras-GAP, Ras-GTP-aza, proteina activatoare, 193
Răspuns imun celular
- imun dobândit, 66
- imun înnăscut, 69
- imun umoral, 65-66
- mediat, 65-66, 191
Răspuns, coeficient control metabolic, 88
Răşini schimbătoare de anioni
Reacția PCR, 27
Receptor acetilcolina, 187-188
- folding, 188
Receptor acetilcolina, folding, 188
Receptor fibronectină, 198
Receptor proteine, 41-42
- factori legare, 188
- în citosol, 41-42
- în membrana plasmatică, 183, 186-189
- trafic reglare, 193-194
Receptor tirozin kinaza, 205
Receptori, 154-155, 186, 193-194
Receptori, acetilcolină, 187-188
- factori, 191-192
- recirculare, 157
- recombinant, 45-49
- reglare 157, 164-168, 191
- reparare, 26-27
Recombinat ADN, 45-49
Redox, potențiale, 126-127
Regiuni hipervariabile,
- în ADN, 48
- în imunoglobuline, 66-67
Regiuni mușchi inimă, 70
Reglare, 166 (Fig), 164-169
- gene, 82, 166-169, 190
- inimă 169
- steroli 168-169
Rep, proteină, 24
Repetitive, secvențe în ADN, 48(tabel), 49
Replicare „end", 204
Replicare ADN, 22-24, 29 (Fig.)
Replicare și transcriere, 29
Replicare, ADN, efect antibiotice, 29
- schema generală, 18
Represie cataboliți, 39
Represie cataboliți, 39
Represor, proteină, operon lac, 39
- control, 130
- lanț, energie liberă standard, 126-127
Restricție, enzime, 25
Restricție, enzime, 25
- situs în cartare, 47, 49

Reticul endoplasmatic rugos, 3, 5 (Fig.), 142
Retinal, cisretinal, all trans, 174
Retrovirusuri, 28, 48
Revers transcriptaza, 18, 28-29
Revers transcriptaza, 24, 29
Rezistenţa bacteriană, 45, 46 (Fig.), 47
Riboflavin fosfat, 94
Riboflavina, 95
Ribonucleaza
- ciclu, 35
- denaturare, 15 (Fig.)
- în Tetrachymena, 38
- legaţi de membrane, 42
- situsuri P şi A, 35
Ribozime,
Ribuloza5-fosfat, 145
Rinichi, excreţie acizi biliari, 157
RMN, spectroscopie, 57
Rodopsina, 174
Rotenona, 127

S
S-Adenosilhomocisteina, 109
Sânge, coagulare, 176
Sarcolema, 71
Sarcoma, VIRUS, 205 (Tabel)
Sarcoplasma, reticul, 71
Sare, punte, proteine, 12
Saturare, fracţie, 185
- cinetică, 188, 196-197
Săruri biliare, 156
Scatchard, grafic, 188-189
Schiff, baze, 96
Schimbări în enzime, 78, 87
Sciziune moleculară, 52
SDS, Sodiu dodecil sulfat, 11-12
Seceră, celule (*sicke-cell*), 33, 47-48, 55, 64
Secundari, mesageri, 85
Secvenţe în proteine, 13-14, 65, 84
- ADN, 28
- ARN, 34
Secvenţe, în proteine, 13-14
Secvenţial, *feed-back*, 88
Sedimentare, coeficienţi, ribozomi, 34
Sedoheptuloză 7-fosfat, 145
Selecţie clonală, limfocite E, 66
Seleniu, deficienţă, 175
Semi-aldehide, 110
Semichinone, 125 (Fig.), 126
Semi-conservativ, replicare ADN, 22, 23 (Fig.)
Semnalizare, peptide, 32, 42, 43 (Fig.)
- particule recunoaştere, 42
- receptor β-adrenergic, 186
- sisteme, 191-193, 204
Senescenţă, 204
Sensibilitate, metabolic control, 88
Sephadex, 13
Serin endopeptidaze, 77
Serin treonin kinaze, 82-83
Serina, 8 (Fig.)
- sinteză 109 (Tabel)
Serotonina, 114-115
- şi fenilcetonuria, 111
Serpine, 58-59
Sevenless, mutantă *Drosophila*, 206
Sf (unităţi flotaţie Svedhergi), 159
Sfingolipide, 173-174
- în semnalizare, 191-192
Sfingomielina, 173, 174
Sfingonina, 174
Sfingozina, 174
She(SH-proteine), 204
Simport, 197
Sindrom de deficienţă imună dobândit, 33-34
Sindrom, X fragil, 48 (Tabel), 49
Sinteza proteică, 30, 35-39, 45
Sinteză proteine, „enhancer", 40
Sinteză, 109 (Tabel), 110
Sistem semnalizare Coenzima A, 95
Sistem, 192-193, 204, 205
Sitostendiona, 178 (Fig.), 179
Situs activ, 76
Situs enzimatic activ, 20
Sodiu, simport, 197
Somatotropina, 16
Southern blot, 47
Spectrina, 194, 195 (Fig.)
Spinobulbar, atrofie musculară, 48 (Tabel)
Spiramicina, 36 (Fig.)
Splicing, 37-38
Splicing, 37-38
Squalen, 154
Src, oncogena, 205 (tabel)
- în semnalizare celulară, 192-193
- omologie, 84
SRE, SREBP, elemente reglatoare steroli şi proteine de legare, 168-169
SRS-A, 178
Standard, potenţial redox, 126
Stare absorptivă, 142-149
Steroide anabolice, 179
Steroide, 178
Steroli, elemente reglatoare, 168-169
Streptococus pneumoniae, transfer patogenitate, 22
Streptogramina, 36 (Fig.)
Streptomicina, 36 (Fig.)
Stres, citoschelet, în, 195
Striat, muşchi, 70-72
- lactat dehidrogenaza, 90
Structură cuaternară, 54
Structură proteine, 58, 66-68, 101, 134
Structură terţiară, 58
Structură, 58, 66-68, 101, 134
Structuri minge de tenis, 194
Subcelular, 4-5
Subcelular, fracţionare, 4-5
Substrat, IRS-1, IRS-2, 187
Subunitate, proteinfosfataza, 163
Succinat
- dehidrogenaza ca marker enzimatic, 5
- dehidrogenaza, 125
- în acidul acizilor tricarboxilici, 124
- transport electronic, 125-126, 128
Sucoza, *vezi* zaharoza
Superfamilii
- proteine G , 189-190
- proteine, 58
- mucoglobuline, 68
Superoxid dismutaza, 131
SV 40, virus, acizi nucleici, 19 (Tabel)
Svedberg, unităţi de flotaţie, 159

T
Tamoxifen, 40
Tamponare, capacitate de, 10
Tandem, repetiţii, 204
TATA, tox, genom, 40
Taurina
Taurocolic, acid, 156
Taxol, 73
TBP(factor de transcriere), 40
Telomeraze, 204
Telomeri, 204
Temperatura, efecte asupra enzimelor, 76
Template, ipoteză sinteza proteinelor, 30
- lanţ transcriere ADN, 27
Teofiline, 85
Terminare, reacţie, 35
- codon, 33
Termofilic (termen), 76
Termostabil, ADN polimeraza, 27
Test Guthrie, 111
Testosteron, 178 (Fig.), 179
Tetracicline, 36 (Fig.)
Tetrahidrobiopterina, 111
Tetrahidrofosfat, 95-96
Tetrahymena, ribozomi, 38
Tetrapiroli, 115
TF II D (factor transcriere), 40
TF III D (factor transcriere), 41
TFIIIA (factor transcriere), 41
TFID (factor transcriere), 40
Tiamin difosfat, 93-94
Tiamina, deficienţă, 94
Tim (translocaza), în mitochondrii, 44
Timina, 19 (Tabel)
Tioesteri, grupări, 95
Tioeteri,ancorare proteine membrane, 185
Tiostrepton, 36 (Fig.)
Tiroida, producţie hormoni, 112
hormoni tiroidieni, 112 (Fig.)
sinteză, 109 (Tabel), 110
Tiroxine, 112
Tirozin 3-monooxigenaza, 113
Tirozin hidroxilaza , 113
Tirozin kinaza, 92
Tirozina, 8 (Fig.)
Tirozinoza, 111
TNF-*tumor necrosis factor*, receptor, 191-192
Tocoferol (vitamina E), 175 191-192
Tom (translocaza), in mitocondrii, 44
Topogenic, secvenţe proteine, 13-14, 42, 65, 84
Toxicitate, oxigen, 131-132
Toxina Pertussis, 190, 162-163
Toxine, 112
- catabolism, 110-112
- catecolamine din, 113
- mecanism, 41
Traducere, ARN, 30-42
Trans-acting, factori sinteză proteică, 40
Trans-acting, factori sinteză proteică, 40
Transaldolaza, 145
Transaminare, 106
- aminoacizi în, 109
- piridoxal fosfat în, 96
Transaminaze, în hepatita virală, 80
Transcetolaza, 145
Transcriere ADN, 127
- primară, 36-39
Transcriere,
- antimetaboliţi, 29
- ARN, 30-42
- control, 3-42
- efectul antibioticelor, 28, 29
- pentru enzime, 166-167
Transcriere, 18, 29, 27-30, 41-42
Transcriere, factori, 40, 166-167
- reglare, 166

Transducţie, 49
Transfecţie, 49
Transfer ARN, 18, 33-34
Transferază terminal, 24
Transferina, 64-65
Transformare, inginerie genetică, 49
Transgeneză, 48
Transgenic, proteine animale, umane, 48
Trans-Golgi, reţea, 43
Translocare, ARNt, 35
Translocaze, mitochondrii, 44
Transloconi, 42
Transmembrane, PTPaze, 84
Transport activ, 196-197
Transport electroni, 130, 132
Transport electroni, lanţ, complex III, 124-128, 130, 132
Transport hemoglobină, disociere, 54
Transport ioni, 197
Transport pasiv, 197 (Fig.)
Transport prin canal, membrana plasmatică, 197
Transport proteine, membrane plasmatice, 197
Transport, elemente de, 168-169
Transport, hemoglobină, 55
Transportori glucoză, 144, 163
Treonin kinaze, 82-83
Treonina, 8 (Fig.)
Triacilglicerol lipaza, 143
Triacilgliceroli, secreţie, 144, 148-149
Triacilgliceroli, uridin difosfogalactoza, 103
- biosinteza, 148, 162
- depozit, 144
- din glucoză, 146
- în chilomicroni, 152
- în digestie, 143
- în plasmă, 158
- secreţie hepatică, 148-149
Triiodotironina, 112-113
Triplu-helix formare, 30
Tripsina, 142
Tripsinogen, 142
Triptofan hidroxilaza, 112
Triskelions, *vezi* şi clatrina, 194
Tropocolagen, 65
Tropomiozina, 195 (Fig.)
Troponina C, vs calmodulina, 83
Troponina, 72
Tubuline, 3, 73, 196
Turnover, proteine, 30
Ţesut adipos brun, 132
Ţesut adipos, 81

U
Ubichinone, 45, 125-126
UDPG *vezi* UDP-glucoză, integrine în, 199
UDP-galactoză, 181
UDP-glucoza, 103, 144
UDP-glucozo pirofosforilaza, 103
UDP-N-acetilglucozamina, 180-181
Ulei, coacere, 160
Ultracentrifugare, lipoproteine plasmă, 159
Ultraviolet radiaţie, dimeri pirimidină, 27
Uracil, 19
Urea, Z-DNA, 19
Ureea
- în disociere hemoglobină, 54
- în denaturare reversibilă, 15
- ciclu, 107-108
- şi morfologia ficatului, 165
Uridiltransferaza, 103
Uridin difosfogalactoza, 103
Uridin Difosfoglucoza, 103, 144
Uridin Difosfoglucoza, 103, 144
Uroporfirinogen, 115-117
Utilizare proteinaza, quencing, 14
Utilizare răşini, 158

V
Vaccinuri, plante transgenice, 48
Valina, 8 (Fig.)
Van der Waal's, interacţiuni în proteine, 12
Vanilin mandelat, 107
Vasopresina, 16
Vectori ADN, 46
Vezicule, receptor trafic, 193-194
Vinculina, 198
Vindecare, rol integrine, 199
Virus aviar, eritroblastoza 205 (Tabel), 131 (Fig.), 132
Virus imunodeficienţă umană (HIV), 28-29
Virus imunodeficienţă, 13
Virus mozaic tutun, experimente ARN, 22
Virus, Vaccinia, 28
Vitameri, 92
Vitamina A, 174
Vitamina B_1, deficienţa, 94
- B_2, 95
- B_3, 96
- B_{12}, 96-97 lipo
Vitamina C, *vezi* Acid Ascorbic
Vitamina D, 174-175
Vitamina E, 175
Vitamina K, 176
Vitamina K, γ-carboxilare, 176
Vitamine hidrosolubile, 92
Vitamine hidrosolubile, 92
Vitamine, 81-97
Vitamine, liposolubile, 174-176
Viteza de reacţie, 76
Viteză iniţială, reacţii mediate enzimatic, 76, 78
Von Gierke's, boala, 139

W
Warfarina, 176
Western blot, 47, 70
Wobble, ipoteza, 33-34

X
X Sindrom fragil, 48 (Tabel), 49
Xantin peroxidaza, 70
Xantin peroxidaza, imonotest, 70
Xeroderma pigmentosum, 27
Xiluloza, 100 (Fig.), 1
Xiluloza-5-fosfat, 145

Z
Zaharoza, 101-102, 143
Zellweger, sindrom, 44
Zidovudina (AZT), 29
Zinc, amprenta (finger), 40-41
Z-variant α1-antitripsina, 63
Zwitterioni, 9
Zwitterioni, ADN, 19

α
α – Antitripsina, electroforeza, 62
α_2-Globuline, 62 (Tabel)
α-Actina, 195 (Fig.)
α-ADN polimeraze, 24
α-Aminoacizi, 8, 9-10
α-Antitripsina, 58, 63-64
- deficienţa, 62
- varianta S, 63
α-Cetoacid dehidrogenaza, complecşi, 94
α-Fetoproteina, 81
α-Globuline, 62 (Tabel)
α-Glucuronidaze, 104 α-Hidroxilaza, 156
α-Hidroxi-pregnenolonă, 178 (Fig.)
α-Hidroxiprogesterone, 178
α-Linoleic acid, 147, 148
α-Lipoproteina *vezi* HDL în lipogeneză, 146, 168
α-Microglobulina, 67
α-Tocoferol, 175
α–Amanitina, 29
α–Amilaze, 142

β
β- ADN, 19
β- Adrenergic, 165, 186, 191
β- Amilaze, 142
β- Glucuronidaze, 104
β- Hidroxi butirat, 137
β- Metazona, 179
β_2- Microglobulina, 67

γ
γ_2- Globulina, punct izoelectric, 11 (Tabel)
γ - Glutamiltransferaza, 80-81
γ- Globuline, în funcţia hepatică, 3, 62

BCU IASI SVICENTIAL UNIVERSITY LIBRARY

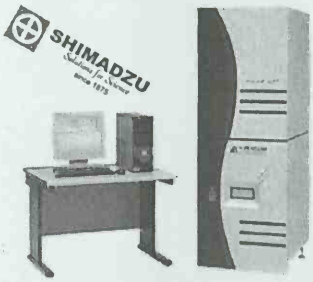
VIOLA

Str. Dumitru Zosima, 58A,
Sect. 1, Bucureşti
Tel. 021-224 55 07/08/09
mail: office@viola.ro
url: www.viola.ro

SR AC ISO 9001 IQNet

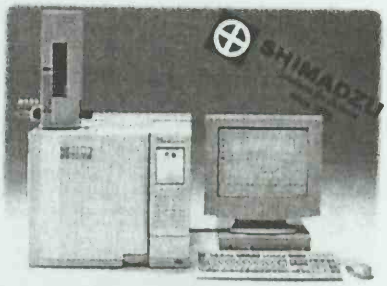
Excelența în Tehnologie

ECHIPAMENTE ŞI INSTRUMENTAȚIE PENTRU LABORATOARE

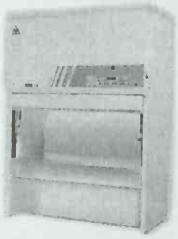


SHIMADZU
Solutions for Science
since 1875

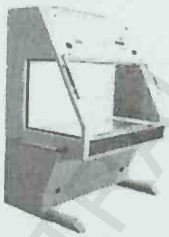
Spectrometrie Cromatografie
Testări Analize mediu

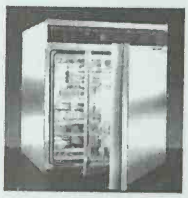


Microbiologie



STERIL
INCINTE STERILE





memmert
Incubatoare
Etuve
Băi de apă

H+P Labortechnik AG
Sisteme Sterilizare

Chimie Analitică

DICKEY-john FUNKE GERBER

Analizoare
Carne
Lactate
Panificație

behr

Kjeldahl
Soxhlet
COD-BOD

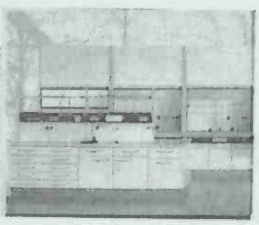
SHIMADZU

BALANȚE

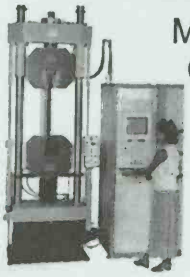
sartorius

Mobilier Laborator

wesemann INTERNATIONAL



Testări Mecanice



Materiale
Ciment
Beton

w+b walter+bai ag

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Lucrarea executată
la Imprimeria „ARDEALUL" Cluj
B-dul 21 Decembrie nr. 146 Cluj-Napoca
Tel.: 413871; Fax: 413883
Comanda nr. 4066/2004

BCU IAȘI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IAȘI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

B.C.U. "M. EMINESCU" IAȘI

642/64 170

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Biochimia ilustrată, acum în Limba Română !

Această carte, care a ajuns la ediția a IV-a în interval de numai 17 ani, a fost tradusă în diferite țări, fiind extrem de apreciată de profesorii și studenții din universitățile europene.

„Biochimie ilustrată" este o carte remarcabilă din cel puțin două puncte de vedere:

- concentrează într-o formă integrată, extrem de sistematică prezentarea structurilor și a proceselor biochimice care au loc la nivel celular, tisular sau sistemic;
- introduce și exemplifică noțiuni actuale și fenomene complicate, utilizând figuri și imagini sugestive însoțite de text minim, dar esențial, ușor de înțeles și urmărit.

Cartea se adresează nu numai studenților sau doctoranzilor, dar și unor tineri cercetători, care studiază biochimia celulară și moleculară, în cadrul unor domenii diverse: biologie, medicină și farmacie, (bio)fizică sau (bio)chimie, biotehnologii, știința și tehnologia alimentelor, științe agricole etc.

Autorii cărții sunt personalități recunoscute la nivel internațional în domeniul Biochimiei. Colectivul de traducători în limba română vă oferă o variantă, sperăm, ușor de înțeles, aducând contribuții la utilizarea și uniformizarea unei terminologii adecvate limbii noastre.

Coordonator al colectivului de traducători,
Prof. dr. Carmen Socaciu

Aprilie 2004

ISBN 973-27-1044-6
9789732710449

Biochimie ilustrată • Biochimie ilustrată • Biochimie ilustrată